

AUS DEM INSTITUT FÜR KLINISCHE MOLEKULARBIOLOGIE
(DIREKTOREN: PROF. DR. STEFAN SCHREIBER
PROF. DR. PHILIP ROSENSTIEL
PROF. DR. ANDRE FRANKE)
IM UNIVERSITÄTSKLINIKUM SCHLESWIG-HOLSTEIN, CAMPUS KIEL
AN DER CHRISTIAN –ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

Entwicklung einer Hochdurchsatzmethode zur Identifizierung und Charakterisierung von Pilzspuren in Stuhlproben

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Miriam Emmy Leni Solovjeva
aus Hemer
Kiel 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. André Franke
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Kaleta
Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2021
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.08.2021
gez.: Prof. Dr. André Franke

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Biologie der Pilze	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Taxonomie	1
1.2 Mykopathien	3
1.2.1 Einteilung: DHS-Schema und Formen der Mykopathien	3
1.3 Das Mykobiom	4
1.4 Erkrankungen mit Zusammenhängen zu Pilzen	4
1.5 Der Zusammenhang zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und Pilzen	5
1.5.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	5
1.5.2 Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)	6
1.5.3 Untersuchungen des Mykobioms	7
1.5.4 Antikörper gegen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ASCA)	8
1.5.5 Einfluss des Rezeptors Dektin-1 im Erkennen von Pilzen und Zusam- menhänge mit CED auf Genebene	9
1.6 Methoden zum Nachweis von Pilzen im Darm	10
1.6.1 Hochdurchsatzverfahren	11
1.7 Ziel der Arbeit	12
2 Methoden	13
2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau und Vorgehen	13
2.2 Material	14
2.2.1 Chemikalien	14
2.2.2 Enzyme	14
2.2.3 Primer	14
2.2.4 Geräte	15
2.2.5 Kommerzielle Kits	16
2.2.6 Sonstiges	16
2.3 Die Kohorten	16
2.3.1 Populationsbasierte Kontrollkohorte (BSP/SPC Kohorte)	16

2.3.2	Kieler Kohorte zu CED (Kindred Kohorte)	16
2.3.3	Food chain Plus Kohorte (FoCuS Kohorte)	17
2.3.4	PSC Kohorte	17
2.4	Extraktion pilzlicher DNA	17
2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.5.1	Etablierung der PCR	19
2.5.1.1	Die Annealingtemperatur	20
2.5.1.2	Die Zyklusanzahl	20
2.5.1.3	Die Primerkonzentration	20
2.5.1.4	Die Templatekonzentration	20
2.5.1.5	Die Magnesiumkonzentration	20
2.5.2	Etablierung der PCR für die ITS1-Region	20
2.5.3	Etablierung der PCR für die ITS2-Region	21
2.6	Konzentrationsmessung	22
2.7	Die Agarosegel-Elektrophorese	22
2.8	Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung	23
2.9	Sequenzierung im Illumina MiSeq	23
2.10	Prozessierung der Rohdaten der Sequenzierung	24
2.10.1	Trimming: Kürzen der Sequenzen	24
2.10.2	Stitching	24
2.10.3	Qualitätskontrolle	24
2.10.4	Chimären-Entfernung	25
2.10.5	Taxonomische Klassifizierung	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Extraktion der pilzlichen DNA aus Stuhl	27
3.2	Entwicklung der PCR für die ITS1-Region	31
3.3	Entwicklung der PCR für die ITS2-Region	34
3.4	Vergleich der etablierten PCR-Protokolle	35
3.4.1	Vergleich der nested-PCR, der einfachen PCR für die ITS1-Region sowie der PCR für die ITS2-Region	36
3.4.2	Vergleich der PCR für die ITS1- sowie die ITS2-Region	38
3.4.3	Analyse des Mykobioms	39
3.4.3.1	Nachgewiesene Pilztaxa in den Kohorten	39
3.4.3.2	Abundanzen der nachgewiesenen Pilztaxa	40
3.4.3.3	Alpha- und Beta-Diversität	46
4	Diskussion	50
4.1	Die Methodik	50
4.1.1	Verwurf der nested-PCR	50
4.1.2	Eine PCR für die ITS1-Region oder die ITS2-Region?	51
4.2	Die Datenanalyse	52

4.3	Die Ergebnisse der Analysen der Kohorten	53
4.3.1	Das Mykobiom	53
4.3.2	Auswertung der Daten	54
4.3.2.1	Das Mykobiom von CED-Patienten	54
4.3.2.2	Das Mykobiom von PSC-Patienten	55
4.3.3	Die Biodiversität	56
5	Zusammenfassung	58

Abbildungsverzeichnis

2.1	Versuchsaufbau zur pilzlichen DNA-Isolation mit Extraktionsschritten.	18
2.2	Struktur der nukleären rRNA-Gene und ihrer ITS-Regionen.	19
2.3	Spezifische Bindestellen im Rahmen der Primerhybridisierung zur Vervielfältigung der ITS1-Region.	21
2.4	Spezifische Anlagerungsregionen der Primer an den nukleären rRNA-Genen zur Vervielfältigung der ITS2-Region.	21
2.5	Entstehung einer chimären Sequenz während einer PCR nach Haas et al. (2011).	26
3.1	Ergebnisse der Optimierung von Extraktionsmethoden für Pilz-DNA aus Stuhlproben.	30
3.2	Ergebnisse der PCR nach optimierter Extraktion sowie PCR für Pilz-DNA aus Stuhlproben.	31
3.3	Struktur der nukleären rRNA-Gene und ihrer ITS-Regionen sowie der genutzten Primer im Rahmen einer nested-PCR.	33
3.4	Ergebnisse des etablierten nested-PCR Protokolls für die Amplifikation von Pilz-DNA aus humanen Stuhlproben.	34
3.5	Ergebnisse der Amplifikation für die ITS2-Region aus Pilz-DNA in Stuhlproben.	35
3.6	Systematik der detektierten Pilze.	37
3.7	Darstellung der Taxonomie der über die ITS2-Region nachgewiesenen Pilztaxa.	39
3.8	Darstellung der gefundenen Pilzsequenzen der Pilztaxa in den verschiedenen Kohorten.	41
3.6	Vergleich zweier Gruppen im Vorkommen der jeweiligen Pilztaxa mithilfe des Wilcoxon-Rangsummentestes In der linken Spalte angegeben sind die jeweiligen Kohorten, die miteinander verglichen wurden.	45
3.7	Parallele Darstellung der Alpha-Diversitäten mit Hilfe des inversen Simpson-Indexes der verschiedenen Kohorten.	47
3.8	Darstellung des Shannon-Indexes zur Veranschaulichung der Alpha-Diversitäten der verschiedenen Kohorten.	48

Tabellenverzeichnis

1.1	Systematik der Pilze am Beispiel von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2.1	Darstellung des PCR-Protokolls für ITS1 von Iliev et al. (2012) mit dem dazugehörigen Maschinen-Protokoll	21
2.2	PCR-Protokoll für ITS2 nach Ihrmark et al. (2012) mit dem dazugehörigen Maschinen-Protokoll	22
3.1	Übersicht über die durchgeführten Versuchsreihen mit den jeweils variierten Reagenzien und Bearbeitungsschritten (Teil 1).	28
3.2	Übersicht über die durchgeführten Versuchsreihen mit den jeweils variierten Reagenzien und Bearbeitungsschritten (Teil 2).	29
3.3	PCR-Protokoll für ITS1 nach 16S V1V2 library preparation protocol for MiSeq und das dazugehörige Maschinen-Protokoll	32
3.4	Nested-PCR-Protokoll für ITS1 mit dem dazugehörigen Maschinen-Protokoll . .	33
3.5	Etabliertes Maschinen-Protokoll für die Amplifizierung der ITS2-Region in Stuhlproben (40 Zyklen)	35
3.6	Vergleich der Detektionsfähigkeit verschiedener Taxa durch Erfassung über die einfache PCR für die ITS1-Region, bzw. der PCR für die ITS2-Region.	36
3.7	Darstellung der Fähigkeit verschiedene Taxa über die nested-PCR für die ITS1-Region, bzw. über die PCR für die ITS2-Region zu detektieren.	38
3.8	Anzahl und Anteil der Proben, die eine bestimmte Anzahl qualitativ ausreichender Sequenzen der ITS1-, bzw. ITS2-Region liefern.	38
3.9	Kohorten und darin nachgewiesene Pilztaxa.	40
3.10	Bray-Curtis-Indizes zum Vergleich der Verschiedenheiten der Pilzgemeinschaften je zweier Kohorten.	49

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Biologie der Pilze

1.1.1 Allgemeines

Pilze zählen zu den Eukaryonten und werden einem eigenen Reich zugeordnet, da sie sich auf zellulärer Ebene vom Tier- und Pflanzenreich unterscheiden (Whittaker, 1969). Sie ernähren sich heterotroph wie die Tiere und verwerten mit Hilfe ihrer Exoenzyme, die auch eine Rolle als Virulenzfaktoren spielen, umgebende Nährstoffe. Da sie kein Chlorophyll synthetisieren, sind sie nicht wie die meisten Pflanzen zur Fotosynthese befähigt. Ihre Lebensform ist saprophytisch, symbiotisch oder parasitisch. Die Zellwand der Pilze besteht aus Glukan, Chitin und Mannan (Suerbaum et al., 2012), während die Zellwand der Pflanzen aus Zellulose besteht und Zellen des Tierreichs keine Zellwand besitzen. Des Weiteren besitzen Pilze wie die Pflanzen Vakuolen (Veses und Gow, 2008) und speichern wie die Tiere Kohlenhydrate in Form von Glykogen (Suerbaum et al., 2012), Pflanzen speichern sie in Stärkeform. Die Pilze kommen in verschiedenen Formen vor. Ihre unizellulären, runde bis ovale Zellen bildenden Vertreter nennen sich Hefen. Filamentöse Pilze bestehen aus fadenförmigen Zellen, die charakteristischer Weise Pilzfäden, sogenannte Hyphen, bilden. Kann ein Pilz in beiden Formen vorkommen, spricht man von einem dimorphen Pilz. Dimorphe Pilze sind obligat pathogen, während Hefen und Fadenpilze bis auf wenige Ausnahmen nur unter besonderen Umständen Mykosen verursachen (Suerbaum et al., 2012).

1.1.2 Taxonomie

Pilze wurden ab dem 18. Jahrhundert aufgrund der Art ihrer sexuellen Sporenbildung in Abteilungen und weiter eingeteilt. Pilze, bei denen kein sexuelles Stadium bekannt war, wurden in der Formklasse der Fungi imperfecti, der Deuteromycota, eingruppiert. Seit es möglich ist die DNA-Sequenzen der Pilze zu vergleichen, kommt es vor, dass zu einer Sequenz zwei Namen vorhanden sind: Einer des teleomorphen und einer des anamorphen Entwicklungsstadiums, da vormals nicht bekannt war, dass es sich um verwandte Spezies handelt. Es existiert also eine duale Nomenklatur, beispielsweise stellen *Eurotium herbariorum* und *Aspergillus glaucus* dieselbe Spezies dar (http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_

=230686 [Stand 18.10.2017, 20:52]).Erst 2011 wurde über den Melbourne Code eine Reform der Nomenklatur mit der Verwendung nur eines Namens beschlossen (McNeill and Taxonomy, 2012). Die Möglichkeit der Sequenzierung von Proben aus der Umwelt hat eine Fülle von ribosomaler DNA (rDNA) -Sequenzen ergeben, die zu Pilzen gehören, zu denen es bislang weder eine Kultur noch eine Spezies gibt. Diese Pilze, die nur ihrer DNA-Sequenz nach existieren und auch als „Environmental Nucleic Acid Sequences“ (ENAS) bezeichnet werden, übersteigen mittlerweile die Zahl der Pilze, zu denen es eine Kultur oder Probe gibt (Hibbett et al., 2011). Nach der „Higher-Level phylogenetischen Klassifizierung der Fungi“ gibt es momentan sieben Abteilungen, bzw. Stämme: Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Glomeromycota sowie die Basidio- und Ascomycota (Hibbett et al., 2007) aus dem Unterreich der Dikarya, das ca. 98% aller Pilze beinhaltet (James et al., 2006).

Tabelle 1.1: Systematik der Pilze am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae*

Königreich	Pilze
Abteilung	Ascomycota
Unterabteilung	Saccharomycotina
Klasse	Saccharomycetes
Ordnung	Saccharomycetales
Familie	Saccharomycetaceae
Gattung	<i>Saccharomyces</i>
Spezies/Art	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Die meisten medizinisch relevanten Pilze entstammen den Ascomycota. Hierzu gehören z.B. *Pneumocystis jirovecii*, der für die Pneumocystis-Pneumonie verantwortlich ist (Phair et al., 1990) sowie *Candida* spp., die Schleimhautinfektionen wie Mundsoor (Muadcheingka and Tantivitayakul, 2015, Song et al., 2015) und Vaginalmykose verursachen (Hedayati et al., 2015, Liu et al., 2014, Zhang et al., 2014), aber auch verantwortlich für Onychomykosen (Feng et al., 2015, Pakshir et al., 2015) und invasive Infektionen sind (De Francesco et al., 2017, Pfaller et al., 2014). Auch der für die Lebensmittelindustrie bedeutsame, intensiv erforschte Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Übersicht von (Nevoigt, 2008), dessen Genom das erste sequenzierte eukaryotische Genom war (Goffeau et al., 1996), gehört zu den Ascomycota. Weitere Vertreter sind *Aspergillus* spp., die vor allem Atemwegserkrankungen wie die allergische bronchopulmonale Aspergillose (Maurya et al., 2005, Oguma et al., 2017) oder das Aspergillom verursachen (Naito and Kurahara, 2017, Takahashi-Nakaguchi et al., 2015) , aber auch eine invasive Aspergillose (Perkhofer et al., 2010, Zhang et al., 2017). Auch *Microsporum* spp. sind Erreger verbreiteter Erkrankungen wie der Tinea corporis und Tinea capitis (Ginter-Hanselmayer et al., 2004, Ungpakorn et al., 2004, Yin et al., 2013). Andere Vertreter sind *Blastomyces dermatitidis* (Blastomykose, bzw. Gilchrist-Krankheit) (Bariola et al., 2011, Kaka and Sarosi, 2017), *Coccidioides immitis* (Kokzidioidomykose) (Li et al., 2014b, Valdivia et al., 2006), *Histoplasma capsulatum* (Histoplasmose) (Lopez et al., 2016, Samayoa et al., 2017) und *Fusarium solani* (Onychomykose, Keratitis, Hautinfektionen, invasive Infektionen) (Guevara-Suarez et al., 2016, He et al., 2011, Homa et al., 2013, Nucci et al., 2003).

1.2 Mykopathien

Es gibt ca. 99.000 umschriebene Pilzarten (Blackwell, 2011, Lee et al., 2010), von denen ca. 50 Arten häufig als Mykoseerreger isoliert werden und weitere 300 Arten als opportunistische Erreger bei stark immunsupprimierten Patienten Erkrankungen hervorrufen (Suerbaum et al., 2012). Die Zahl an Pilzerkrankungen hat über die letzten Jahre und Jahrzehnte stetig zugenommen (Beck-Sague and Jarvis, 1993, Groll et al., 1996, Marr et al., 2002, Pasqualotto et al., 2008), da diese Erkrankungen vor allem Personen mit geschwächtem Immunsystem betreffen und sich die Zahl der Patienten mit Immundefizienz erhöht hat. Dies ist z.B. zurückzuführen auf zunehmende Therapiemöglichkeiten gegen das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), Chemotherapien bei Leukämien oder anderen Krebserkrankungen, aber auch auf verbesserte medikamentöse Strategien zur Unterdrückung des Immunsystems z.B. bei Transplantationen (Übersicht von Perlroth et al., 2007).

1.2.1 Einteilung: DHS-Schema und Formen der Mykopathien

Obwohl Pilze taxonomisch eingeteilt werden, hat sich in der Klinik der Gebrauch des DHS-Schemas nach Rieth (Rieth, 1967) durchgesetzt: Hier werden Pilze in Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze (DHS) eingeteilt. Es erfahren Pilze eine Sonderstellung, die als dimorphe Pilze in Hefen- oder Schimmelpilzform vorkommen können. Dermatophyten spielen eine wichtige Rolle in der Humanmedizin, da etwa 20-25% der Weltbevölkerung an oberflächlichen Mykosen leiden (Male, 1990). Des Weiteren ergab eine Untersuchung der European Nail Society bei 31,6% zufällig ausgewählter Patienten klinisch das Vorliegen einer Tinea pedis und/oder eine Onychomykose der Zehennägel (Leitlinien „Tinea der freien Haut“ der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Stand Oktober 2008). Unter den Hefen spielen *Candida* spp. die wichtigste Rolle für den Menschen. Sie sind wie bereits aufgeführt z.B. die Erreger des oralen Soor oder des Vaginalsoor. Nach einer von Foxman et al. (2013) durchgeführten Untersuchung, erkrankten ca. 29-49% der Frauen einmal in ihrem Leben an Vaginalsoor. *Candida* spp. können im Rahmen systemischer Infektionen auch alle anderen Organe befallen. Eine invasive Infektion ist besonders gefährlich aufgrund der hohen Mortalität (Gudlaugsson et al., 2003, Li et al., 2017). Unter den Schimmelpilzen stellen *Aspergillus* spp. einen häufigen Vertreter dar. Sie sind v.a. in Atemwegserkrankungen involviert und eine Sensibilisierung führt bei Asthmatikern zu einer geringeren Kontrolle der Erkrankung und einem früheren Beginn (Masaki et al., 2017, Maurya et al., 2005, Tanaka et al., 2016). Allgemein nennen sich Krankheiten aufgrund von Pilzinfektionen Mykopathien, sie können in vier Unterkategorien eingeordnet werden: Es gibt den Myzetismus, der eine akute Vergiftung durch Verzehr von Giftpilzen, wie z.B. des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*), darstellt (Ma et al., 2017, Vendramin and Brvar, 2014). Chronische Vergiftungen durch Lebensmittel, die Pilzgifte wie das Aflatoxin beinhalten, werden Mykotoxikosen genannt (Chu et al., 2017, Peraica et al., 1999, Qi et al., 2015), allergische Reaktionen aufgrund einer Sensibilisierung auf Pilzbestandteile Mykoallergosen (Masaki et al., 2017, Tanaka et al., 2016, Torres-Rodriguez et al., 2012). Eine Mykose ist schlussendlich die Infektion mit dem Pilz selbst. Sie kann weiter klassifiziert werden nach Loka-

lisation (topisch oder systemisch), Infektionsweg (endogen oder exogen), Ätiologie (primär oder sekundär) und Erreger selbst.

1.3 Das Mykobiom

Das Mikrobiom beinhaltet die Gesamtheit aller im Gastrointestinaltrakt (GIT) eines Menschen anzutreffenden Mikroorganismen. Während der bakterielle Anteil des gastrointestinalen Mikrobioms Bestandteil zahlreicher Untersuchungen war und meist mit dem Mikrobiom gleichgesetzt wird, ist der Anteil der Pilze, das sogenannte Mykobiom, eher gering erforscht worden. Die totale Anzahl pilzlicher Mikroorganismen in der Mundhöhle wird auf $10^0 - 10^2$ Kolonie bildende Einheiten (KbE), bzw. colony forming units (CFU)/ml geschätzt. Im Magen sind es 0-102 CFU/ml, im Jejunum $0 - 10^2$ CFU/ml, im Ileum $10^2 - 10^3$ CFU/ml und im Kolon $10^2 - 10^6$ CFU/ml (Simon and Gorbach, 1984). Im Vergleich hierzu wurden auf bakterieller Seite $10^8 - 10^9$ CFU/ml im Speichel (Evaldson et al., 1982), $0 - 10^3$ CFU/ml im Magen, $0 - 10^5$ CFU/ml im Jejunum, $10^3 - 10^7$ CFU/ml im Ileum und $10^{10} - 10^{12}$ CFU/ml im Kolon gefunden (Simon and Gorbach, 1984). Kultur-unabhängige Analysen zeigen, dass sich der Anteil pilzlicher Gene am gesamten Mikrobiom im Stuhl auf 0,03% beläuft und in Mukosa-assoziierten Arealen auf 0,02% (Ott et al., 2008b). Während auf bakterieller Seite 1150 Arten (Qin et al., 2010) gefunden wurden, waren es laut einer von Suhr and Hallen-Adams (2015) zusammengestellten Übersicht über 36 verschiedene Studien 267 verschiedene Pilzarten. Die hier am häufigsten gefundenen Darmpilze sind *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium allii*, *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta* und *Debaryomyces hansenii* und *Galactomyces geotrichum*. Ein Großteil der 267 Pilzarten wurde nur in einer Studie nachgewiesen und 63,4% der in mehreren Studien nachgewiesenen Pilze waren Hefen.

1.4 Erkrankungen mit Zusammenhängen zu Pilzen

Die gastrointestinale Besiedlung durch Pilze wie *Candida albicans* gilt als Hauptreservoir und Quelle invasiver Infektionen wie der invasiven Candidiasis. *Candida albicans*, der prädominierende Darmpilz, kolonisiert den Gastrointestinaltrakt (GIT) und besitzt die Fähigkeit in Gewebe einzudringen und im Körper zu disseminieren, wenn das Mikrobiom des Darmes gestört, die Permeabilität der intestinalen Mukosa erhöht oder der Wirt immungeschwächt ist (Koh et al., 2008). So stimmte beispielsweise der aus dem Blut von Patienten mit invasiver Candidiasis isolierte Stamm, mit dem isolierten Stamm aus dem GIT der Probanden in 81% der untersuchten Fälle überein (Miranda et al., 2009). Die Besiedlung des Darmes durch *Candida* spp. wurde mit einer Reihe von Krankheiten assoziiert wie dem Diabetes mellitus (Gosiewski et al., 2014, Soyucen et al., 2014), hämatologischen Malignitäten (Tomoda et al., 1988), dem Morbus Crohn (Chehoud et al., 2015, Hoarau et al., 2016, Li et al., 2014a, Liguori et al., 2016, Sokol et al., 2017, Standaert-Vitse et al., 2009) und der Graft-versus-Host-Reaktion (van der Velden et al., 2013). Hepatitis B (Chen et al., 2011) und Pouchitis (Kuhbacher et al., 2006) besitzen einen Zusammenhang zur Pilzdiversität, welche meistens positiv mit der Erkrankungsprogression und

-schwere korreliert. Auch die Pilzdiversität der Nase korreliert positiv mit einer Erkrankung an allergischer Rhinitis (Jung et al., 2015), während die Pilzdiversität der Lunge negativ mit einer Erkrankung an Mukoviszidose korreliert (Botterel et al., 2017, Delhaes et al., 2012). Bei Magengeschwüren konnte eine signifikante Besiedelung des Magens durch Pilze mit bis zu 106 Zellen/ml gezeigt werden (Zwolinska-Wcislo et al., 2001). Aber auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen werden mit einer Veränderung des Mykobioms in Verbindung gebracht.

1.5 Der Zusammenhang zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und Pilzen

Zunächst folgt eine Definition der häufigsten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Darüber hinaus folgt eine Definition der primär sklerosierenden Cholangitis, welche mit CED assoziiert und im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Bedeutung ist. Anschließend wird auf die bislang erforschten Zusammenhänge zwischen den Erkrankungen und dem Mykobiom des GIT eingegangen.

1.5.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die Inzidenz von CED hat im letzten Jahrhundert signifikant zugenommen (Jacobsen et al., 2006, Lopez-Serrano et al., 2009, Vind et al., 2006, Ronnblom et al., 2010) und weist eine geographisch unterschiedliche Verteilung auf mit einem Nord-Süd-Gefälle (Shivananda et al., 1996) sowie einer hohen Inzidenz in Europa und einer vergleichsweise niedrigen Inzidenz in Asien (systematische Literaturrecherche von Molodecky et al. (2012)). Die beiden häufigsten CED-Erkrankungen sind Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Morbus Crohn ist eine chronisch entzündliche, schubweise verlaufende Erkrankung, die den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen kann und durch einen diskontinuierlichen, segmentalen Befall gekennzeichnet ist, der alle Darmwandschichten betreffen kann. Zu den häufigsten Beschwerden gehören Abdominalschmerzen, unblutige Diarrhoe, Fieber und Zeichen eines Darmverschlusses (nach einer auf nationalen und internationalen Richtlinien basierenden Übersicht von Baumgart (2009)). Viele Patienten leiden auch an extraintestinalen Manifestationen wie Arthritis, Uveitis, Iritis, Hepatitis oder einer Manifestation der Haut in Form eines Erythema nodosum oder Pyoderma gangraenosum. Des Weiteren kann es im Rahmen der Erkrankung zur Ausbildung von Fisteln und Abszessen kommen sowie zur Ausbildung von Strikturen und Stenosen (Rankin et al., 1979). Die Inzidenz des Morbus Crohn liegt in Europa bei 0,5 – 9,2 pro 100.000 Einwohner (Abakar-Mahamat et al., 2007, Arin Letamendia et al., 2008, Chouraki et al., 2011, Economou et al., 2007, Gheorghe et al., 2004, Lakatos et al., 2011, Lapidus, 2006, Lopez-Serrano et al., 2009, Ott et al., 2008a, Rodrigo et al., 2004, Romberg-Camps et al., 2009, Shivananda et al., 1996, Sincic et al., 2006, Vind et al., 2006) und die Prävalenz bei 1,51 - 213 pro 100.000 Einwohner (Gheorghe et al., 2004, Jacobsen et al., 2006, Juillerat et al., 2008, Lapidus, 2006). Die höchste altersspezifische Inzidenz liegt hier zwischen 16 und 34 Jahren (Lakatos et al., 2011, Lapidus, 2006, Ott et al., 2008a, Rodrigo et al., 2004, Sincic et al., 2006). Die Colitis ulcerosa ist eine zurzeit unheilbare Entzündungserkrankung des Dickdarms auf Mucosaneiveau, die diesen, vom Rektum an nach

proximal fortschreitend, komplett befallen kann und eine kontinuierliche Verteilung aufweist. In seltenen Fällen kommt es zur „Backwash-Ileitis“, einem Übergreifen des Entzündungsprozesses auf die letzten 10-20cm des terminalen Ileums. Zu den häufigsten Beschwerden gehören Abdominalschmerzen, blutig-schleimige Durchfälle, Tenesmen und Gewichtsverlust (Konsensdarlegung der European Crohn's and Colitis Organisation, Stange et al. (2008). Extraintestinale Manifestationen wie z.B. Arthritiden, Hautmanifestationen wie Pyoderma gangraenosum oder Erythema nodosum oder ein Befall der Augen sind möglich (Greenstein et al., 1976, Manser et al., 2016). Darüber hinaus besteht laut einer Literaturrecherche von Eaden et al. (2001) ein ab dem 10., 20., bzw. 30. Erkrankungsjahr um 2%, 8%, bzw. 18% erhöhtes Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken. Weitere Komplikationen sind Blutungen, das toxische Megakolon sowie eine Perforation (Lin et al., 2016). Die Inzidenz liegt in Europa zwischen 0,97 und 24,5 pro 100.000 Einwohner (Abakar-Mahamat et al., 2007, Arin Letamendia et al., 2008, Chouraki et al., 2011, Economou et al., 2007, Gheorghe et al., 2004, Lakatos et al., 2011, Lopez-Serrano et al., 2009, Ott et al., 2008a, Rodrigo et al., 2004, Romberg-Camps et al., 2009, Ronnblom et al., 2010, Shivananda et al., 1996, Sincic et al., 2006, Vind et al., 2006) und die Prävalenz bei 2,42 - 105 pro 100.000 Einwohner (Gheorghe et al., 2004, Jacobsen et al., 2006, Juillerat et al., 2008). Bei 21- bis 44-Jährigen ist die altersspezifische Inzidenz am größten (Lakatos et al., 2011, Rodrigo et al., 2004, Sincic et al., 2006). Aufgrund des Höhepunktes der Inzidenzen von CED bereits in jungen Jahren zu Beginn des Berufslebens, führen CED zu hohen direkten und indirekten Kosten (Gibson et al., 2008, Kappelman et al., 2008). Die Ätiologie ist sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa bisher nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen, bei dem genetische Faktoren wie z.B. Variationen in den Genen CARD9, CARD15/NOD2, IL23R oder IL10 (Franke et al., 2010, Lesage et al., 2002, Liu et al., 2015, Rivas et al., 2011) eine Rolle spielen, aber auch Umwelteinflüsse wie Rauchen (Lindberg et al., 1992, Mahid et al., 2007) oder der Gebrauch von oralen Kontrazeptiva (Cornish et al., 2008, Timmer et al., 1998) oder von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) (Takeuchi, 2006). Des Weiteren spielen auch Infektionen mit *Helicobacter pylori* (Meta-Analysen von Luther et al. (2010), Wu et al. (2015), dem Helminthen *Trichuris suris* (Summers et al., 2005) oder *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (Studienübersicht von Naser et al. (2014) eine Rolle in der Ätiologie und Pathogenese sowie psychosomatische Faktoren (Chan et al., 2017, Mittermaier et al., 2004, Walker et al., 2008), die Ernährung (Chiba, 2010) und Fehlfunktionen im Zusammenspiel zwischen intestinalem Immunsystem und der Darmflora (Duchmann et al., 1995).

1.5.2 Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC)

Die primär sklerosierende Cholangitis tritt bei 2,9% - 3,7% der Patienten mit Colitis ulcerosa (Terg et al., 2008, Olsson et al., 1991) und 3,4% der Patienten mit Morbus Crohn auf (Rasmussen et al., 1997). Andersherum liegt in 66% - 76,4% der Patienten mit PSC ebenfalls eine CED vor, welche in 64,8% - 75% eine Colitis ulcerosa ist (Bambha et al., 2003, Boonstra et al., 2012, Lindkvist et al., 2010). Sie ist eine fibrosierende Entzündung der intra- und extrahepatischen Gallengängen unklarer Ätiologie. Durch die Entzündung kommt es zu Strik-

turen und durch die hierdurch gestaute Galle zu Erweiterungen der Gallengänge, so dass ein perlschnurartiges Bild entsteht. Da die Galle toxisch auf die Leberzellen wirkt, kann es zu einer sekundär-biliären Leberzirrhose kommen (Arastéh et al., 2012). Zudem beträgt das Risiko nach zehn, bzw. 20 Jahren ein cholangiozelluläres Karzinom zu entwickeln jeweils 9%. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer CED erhöht sich das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken von 2% auf 11-14% nach zehn Jahren und von 2-7% auf 18-31% nach 20 Jahren (Claessen et al., 2009, Terg et al., 2008). Zu den häufigsten Symptomen zählen laut der aktuellen S2k-Leitlinie von 2017 Müdigkeit, Juckreiz, Bauchschmerzen und Ikterus sowie eine Neigung zu bakteriellen Cholangitisschüben (https://www.dgvs.de/wp-content/uploads/2017/07/021-0271_S2k_Autoimmune_Lebererkrankungen_2017-07_01.pdf [Stand 19.01.2018, 17:34]). Die Prävalenz der PSC liegt in Deutschland bei 1-5 pro 100.000 Einwohner (https://www.dccv.de/fileadmin/public/die_dccv/AKs/PSC/11_psc_flyer.pdf [Stand 18.10.2017, 18:06]). Eine schwedische Studie zeigte eine Prävalenz von bis zu 16,2 pro 100.000 Einwohner sowie eine Inzidenz von 1,22 pro 100.000 Einwohner, welche in den letzten zehn Jahren um 35,1% angestiegen ist (Lindkvist et al., 2010). Männer sind mit 65% - 71,4% häufiger betroffen als Frauen und das mittlere Alter beim Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt bei 37- 40 Jahren (Bambha et al., 2003, Boonstra et al., 2012, Lindkvist et al., 2010).

1.5.3 Untersuchungen des Mykobioms

Pilze im Darm konnten bei Gesunden und CED-Patienten nachgewiesen werden. Während die meisten dieser Pilze kommensale Formen sind, gibt es auch einige fakultativ pathogene Pilze. Diese Pilze verursachen normalerweise keine Erkrankungen, können aber bei supprimiertem Immunsystem hierzu führen. Vergleichende Studien über die Komposition des Mykobioms bei Gesunden und CED-Patienten wurden bislang meistens an nur wenigen Probanden durchgeführt. Die Unterschiede in der interindividuellen Variabilität des Mykobioms wurden hierbei als signifikant bei Morbus Crohn-Patienten (Li et al., 2014a), bzw. hoch bei Patienten mit CED (Ott et al., 2008b) bewertet. Während bei Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant erhöhte Diversität (Ott et al., 2008b, Li et al., 2014a) und Abundanz an Pilzen festgestellt wurde (Liguori et al., 2016, Ott et al., 2008b, Li et al., 2014a), konnte diese Tendenz bei Colitis ulcerosa-Patienten zwar beobachtet werden, jedoch stellte sie sich nicht als signifikant dar (Ott et al., 2008b). Andere Studien fanden jedoch eine signifikant verminderte Diversität (Chehoud et al., 2015, Liguori et al., 2016, Sokol et al., 2017) und Abundanz (Chehoud et al., 2015) bei CED-Patienten. Eine Behandlung mit Fluconazol, einem Antimykotikum, oder dem Probiotikum Lacidofil führt im Mausexperiment und bei Patienten mit Colitis ulcerosa zu einer Reduktion der Krankheitsaktivität und einer Reduktion der Größe der inflammatorischen Läsionen (Iliev et al., 2012, Zwolinska-Wcislo et al., 2009). Auch Patienten, die aufgrund einer Colitis ulcerosa eine Kolektomie mit ilealer Pouchanlage erhalten hatten, half das Probiotikum eine Remission aufrecht zu erhalten und die Pilzdiversität zu reduzieren (Kuhbacher et al., 2006). Andersherum führte die Inokulation mit *Candida albicans* in Ratten, die an durch Cysteamin induzierten duodenalen Ulzera leiden, zu vermehrten und schwereren Ulzerationen und deren verzögerten Heilung (Jin et al., 2008) sowie Erhöhung des Perforationsrisikos (Nakamura et al.,

2007). Auch bei Patienten mit Magenulzera führte eine *Candida* spp. Besiedelung der Ulzerationen zu einer längeren Krankheitsdauer, größeren Ulzerationen und verzögerter Regression (Zwolinska-Wcislo et al., 2001). Eine verzögerte Heilung von Magenulzera unter Inokulation mit *Candida* spp. war auch im Tiermodell ersichtlich und verstärkte sich unter Acetylsalicylsäure- oder Ranitidin-Gabe (Brzozowski et al., 2009). Da bakterielle Untersuchungen der Stuhlproben von CED-Patienten einen signifikanten Rückgang der Diversität darlegen (Chehoud et al., 2015, Liguori et al., 2016, Li et al., 2012, Sokol et al., 2017), wird von einer inversen Korrelation (Kuhbacher et al., 2006) zwischen Pilzen und Bakterien ausgegangen ohne jedoch Rückschlüsse auf die Kausalität zuzulassen. Des Weiteren war ersichtlich, dass sich das Spektrum der operationalen taxonomischen Einheiten (operational taxonomic unit, OTU) im Stuhl signifikant von dem der Mukosa assoziierten OTU's unterscheidet (Ott et al., 2008b). In einer OTU werden Sequenzen zusammengefasst, die genetisch zu 97% identisch sind. Diese Bündelung erfolgt, da bei der DNA-Sequenzierung Fehler möglich sind, diese jedoch nicht die Diversität einer Probe verfälschen sollen (Callahan et al., 2016). Bei der Untersuchung von Mukosabiopsien von Morbus Crohn-Patienten aus entzündeten und unentzündeten Bereichen konnte eine größere Artenvielfalt und Diversität in den entzündeten Bereichen nachgewiesen werden. Hier kamen fakultativ pathogene Pilze anteilmäßig häufiger vor, während kommensale Pilze wie *Saccharomyces* in ihren Zahlen abnahmen (Li et al., 2014a). Im Tierexperiment waren die Pilze bei Induktion einer Kolitis ebenfalls in der Lage in die Mukosa einzudringen (Iliev et al., 2012, Zwolinska-Wcislo et al., 2009), während sie normalerweise im Lumen verbleiben. Auch beim Menschen konnte eine erhöhte Permeabilität der Darmwand bei Morbus Crohn-Patienten und ihren Angehörigen gefunden werden (Buhner et al., 2006). Bei Patienten mit erhöhter intestinaler Permeabilität kam es zudem zu einer erhöhten Rate an Rezidiven (Wyatt et al., 1993). Die erhöhte Permeabilität der Darmwand wird auch in Zusammenhang mit den v.a. bei Morbus Crohn-Patienten gefundenen Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* gebracht.

1.5.4 Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)

ASCA sind Antikörper, die, wie aus der Bezeichnung hervorgeht, gegen eine Zellwandkomponente von *Saccharomyces cerevisiae*, einem kommensalen Pilz, gebildet werden. Genauer betrachtet kommt das Epitop, gegen das sich ASCA richten, bei verschiedenen Hefen vor, weshalb eine Kreuzreaktivität von ASCA Immunglobulin G (IgG) mit den Antigenen anderer Hefen gegeben ist. Dies lässt auf eine abnorme Immunsensitivierung schließen, die einen Verlust der Toleranz gegenüber kommensaler Antigene bedeutet (Schaffer et al., 2007). So kann auch *Candida albicans*, ein fakultativ pathogener Kommensale, die Bildung von ASCA induzieren (Jawhara et al., 2008, Schaffer et al., 2007, Standaert-Vitse et al., 2006) und die *Candida tropicalis*-Abundanz korreliert positiv mit dem ASCA Titer (Hoarau et al., 2016). ASCA kommen bei 57-72% der Morbus Crohn-Patienten vor, sowie bei 20-33,6% ihrer Angehörigen ersten Grades (bezogen auf Familien mit mehreren Morbus Crohn-Fällen), wohingegen sie bei der normalen Bevölkerung bei 0-8% vorkommen (Sendid et al., 1998, Standaert-Vitse et al., 2009, Vermeire et al., 2001, Walker et al., 2004) und bei Patienten mit Colitis ulcerosa in nur 8% (Walker et al., 2004). Sie sind spezifisch (86-91%) mit einer Sensitivität von 52-61% (Buckland et al., 2005, Peeters et al.,

2001, Quinton et al., 1998, Walker et al., 2004) und mit einem schwereren Krankheitsverlauf (Ferrante et al., 2007, Forcione et al., 2004, Mow et al., 2004, Vasilias et al., 2000, Walker et al., 2004) oder einem Beginn in jungen Jahren assoziiert (Quinton et al., 1998, Vasilias et al., 2000). Die Titer der Antikörper sind bei Erkrankten relativ konstant (Muller et al., 2005, Rieder et al., 2011, Teml et al., 2003) und eignen sich durch ihre Unabhängigkeit von Therapie und Dauer der Erkrankung als prädiktive Marker für Morbus Crohn. Neuesten Erkenntnissen zufolge sind sie auch schon vor dem Auftreten der Erkrankung nachweisbar (Israeli et al., 2005). Andere Anti-Glycan-Antikörper gegen die Zellwand von Pilzen sind Anti-Laminaribiosid Kohlenhydrat Antikörper (ALCA) und Anti-Chitobiosid Kohlenhydrat Antikörper (ACCA) (Dotan et al., 2006, Sendid et al., 2008, Seow et al., 2009). In Morbus Crohn-Patienten beträgt die Prävalenz dieser Antikörper 37,5% für ALCA und 36% für ACCA (Dotan et al., 2006). Diese Antikörper können nicht nur im Zuge der Morbus Crohn-Diagnostik genutzt werden, sondern serologische Tests zum Nachweis invasiver Candidosen ergänzen (Sendid et al., 2008). Bei der Erkennung von Pilzen und der Bildung von Antikörpern spielt das Immunsystem eine besondere Rolle und die Rezeptor- und Genebene liefert weitere Aspekte des Zusammenhangs zwischen Pilzen und CED.

1.5.5 Einfluss des Rezeptors Dektin-1 im Erkennen von Pilzen und Zusammenhänge mit CED auf Genebene

Pilze werden von der angeborenen Immunabwehr über spezielle Rezeptoren, den pattern recognition receptors (PRR), anhand hoch konservierter Strukturen, den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)), wie β -Glucan, erkannt. Hierbei spielt unter anderem der PRR Dektin-1 eine wichtige Rolle. Da dieser gut untersucht ist und eine Abhandlung aller Rezeptoren mit anschließenden Signalwegen und assoziierten Genen äußerst komplex wäre, erfolgt dies beispielhaft am PRR Dektin-1. Dektin-1 ist ein Rezeptor verschiedener Zellen der angeborenen Immunabwehr (Taylor et al., 2002), der Glykane erkennt, die zur Zellwand fast aller Pilze gehören (Brown and Gordon, 2001, Taylor et al., 2002). Er vermittelt verschiedene zelluläre Funktionen wie das Binden von Pilzen, die Aufnahme und das Abtöten sowie die Produktion von Zyto- und Chemokinen (Brown et al., 2003, Gantner et al., 2003, Herre et al., 2004, Rogers et al., 2005, Steele et al., 2003, Underhill et al., 2005). Dektin-1 defiziente Mäuse (Clec7a^{-/-}) wiesen eine verstärkte Besiedlung durch *Candida tropicalis* nach Inokulation hiermit auf. Bei zusätzlich über Dextransulfat (DSS) induzierter Kolitis, erlitten diese Mäuse einen schwereren Krankheitsverlauf mit Eindringen von *Candida tropicalis* in die Darmmukosa. Der Krankheitsverlauf wurde durch Gabe des Antimykotikums Fluconazol gemildert und ein Transfer des Mykobioms dieser Mäuse auf Wildtyp-Mäuse inklusive einer anschließenden Kolitisinduktion führte zu keiner schwereren Kolitisform. Umgekehrt führte ein Mykobiomtransfer von Wildtyp-Mäusen auf Clec7a^{-/-}-Mäusen zu einer schwereren Kolitisform. Dies unterstreicht die Rolle des Genotyps bezogen auf den Krankheitsphänotyp (Iliev et al., 2012). Auch im Menschen konnte eine erschwerte Verlaufsform des Morbus Crohn sowie ein erhöhtes Risiko für die Notwendigkeit einer Operation bei Colitis ulcerosa mit einem Polymorphismus im Clec7a-Allel assoziiert werden (Iliev et al., 2012). Zusätzlich ist auch das Caspase

recruitment domain-containing protein 9 (CARD9), das die Signalweiterleitung von Dektin-1 mediert, auf genetischer Ebene mit CED assoziiert (Franke et al., 2010, Zhernakova et al., 2008). Des Weiteren führt Dectin-1 zur Differenzierung von Interleukin-17 (IL-17) produzierenden T-Helferzellen (Th17-Zellen) (Agrawal et al., 2010, LeibundGut-Landmann et al., 2007, Osorio et al., 2008). Th17-Zellen haben eine Schlüsselrolle in der Initiierung von Mechanismen, die zu chronischen intestinalen Entzündungen führen. IL-17 wurde in erhöhten Konzentrationen in den Biopsien entzündeter Mukosa gefunden (Fujino et al., 2003) und CED-Patienten wiesen erhöhte IL-17-Spiegel auf (Fujino et al., 2003, Holtta et al., 2008, Jyonouchi et al., 2010). Die Behandlung mit einem IL-17 A-Antikörper führte in Morbus Crohn-Patienten zu keiner Verbesserung des Krankheitsbildes sowie zu einer Zunahme an Infektionen (Hueber et al., 2012). Eine andere Studie wurde aufgrund einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes abgebrochen (Targan et al., 2016). Auch Patienten mit chronischer mukokutaner Candidiasis wiesen eine verminderte IL-17-Sekretion und eine verminderte Anzahl an Th17-Zellen auf (Eyerich et al., 2008). IL-23 und IL-1 β spielen für die Funktion der Th17-Lymphozyten ebenfalls eine wichtige Rolle. IL-23 ist ein Zytokin, welches die Ausbreitung und Aufrechterhaltung von Th17-Lymphozyten fördert. In einer genomweiten Assoziationsstudie konnte eine starke Assoziation eines Gens, das für eine Untereinheit des Rezeptors für IL-23 kodiert, mit der Erkrankungswahrscheinlichkeit für Morbus Crohn gefunden werden (Duerr et al., 2006). IL-1 β spielt in der Differenzierung von Th17-Zellen eine Rolle (Mailer et al., 2015). Es wird u.a. durch das Erkennen eines PAMPs durch das Inflammasom, einem Multi-Protein-Komplex, sezerniert (Joly et al., 2009). Das Inflammasom kann durch Dektin-1 aktiviert werden (Gringhuis et al., 2012) und wird von einem Protein kontrolliert, welches durch das Gen NLRP3 kodiert ist. NLRP3-Varianten prädisponieren für Morbus Crohn und eine NLRP3-Defizienz führt zu verminderter Produktion von IL-1 β (Villani et al., 2009). Apathogene *Candida albicans* Mutanten, die unfähig sind Pseudohyphen oder Hyphen zu bilden, welche die virulente Form von *Candida albicans* darstellen (Lo et al., 1997), schaffen es nicht die Bildung von IL-1 β zu triggern (Joly et al., 2009) und somit nicht eine Entzündung auszulösen. Allgemein wurden verschiedene Gene rund um die Th17-Zellen mit CED in Verbindung gebracht (Barrett et al., 2008, Franke et al., 2010). Somit gibt es auch verdeutlicht anhand des Beispiels des PRR Dektin-1 sowie angegliederter Mechanismen der Immunantwort bis hin auf Genebene viele Hinweise auf eine Rolle des Mykobioms in Entzündungsprozessen im GIT.

1.6 Methoden zum Nachweis von Pilzen im Darm

Nachweismethoden pilzlicher Organismen des GIT sind unterteilbar in Kultur-abhängige und -unabhängige Verfahren. Eines der am häufigsten verwendeten Verfahren ist die Anzucht auf dem Selektivnährmedium Sabouraud Agar, welches das Wachstum bakterieller Spezies inhibiert. Die genaue Spezieszuordnung erfolgt makroskopisch und mikroskopisch (Kannan et al., 2006) mithilfe verschiedener Färbungen wie z.B. in der Übersicht von Musial et al. (1988) dargestellt. Des Weiteren existieren eine Vielzahl an Tests zur Pilzidentifikation. Hierzu gehören z.B. biochemische Tests zur Verwertung von Kohlenhydraten (Huppert et al., 1975, Kali et al., 2015, Marinho et al., 2010, Steadham et al., 1986) oder Nitraten (Huppert et al., 1975, Steadham et al., 1986),

Antigen-Tests (DiSalvo et al., 1980, Dominic et al., 2009), der Keimröhren-Test (Marinho et al., 2010, Sheppard et al., 2008) oder Tests zur Produktion von Urease (Huppert et al., 1975, Seeliger, 1956), Phenoloxidase (Kabasawa et al., 1991) oder Nitratreduktase (Hopkins and Land, 1977, Kabasawa et al., 1991). Seit der Entwicklung der PCR wurden Kultur-abhängige Verfahren jedoch zusehends verlassen. Diese sind den Kultur-unabhängigen Verfahren darin benachteiligt, dass nicht alle Pilze gleich gut anzüchtbar sind. Spezies, die zahlenmäßig überwiegen oder eine kürzere Replikationszeit aufweisen und sich somit schneller vermehren, können so andere Arten überwuchern (Nagano et al., 2010). Pilze, die antimykotische Komponenten sezernieren sind ebenfalls bekannt (Pereira et al., 2013, Yuen et al., 1999). Auch wenig anspruchsvolle Pilze sowie Pilze, die das genutzte Nährmedium am besten verwerten können, haben einen Vorteil (Griffith et al., 2009). Je nach verwendetem Nährmedium werden daher unterschiedliche Pilze kultiviert (Gouba et al., 2013, Scognamiglio et al., 2010). Zu Unterschieden hierbei kommt es auch herstellerspezifisch bei ein und derselben Agarform (Brun et al., 2001). Zudem gibt es Spezies, für die Wechselwirkungen mit anderen Spezies essentiell sind. Können diese Wechselwirkungen in der Kultur nicht fortbestehen, mindert dies den Anzuchterfolg (Partida-Martinez et al., 2007). Das Einfrieren und Auftauen von Proben verändert weiterhin das Spektrum der angezüchteten Pilze (Griffith et al., 2009). Somit gibt es eine Vielzahl an Punkten, die ein Ergebnis verfälschen und verglichen mit anderen Methoden detektiert die Kultur oftmals deutlich weniger Spezies (Botterel et al., 2017, Chen et al., 2011, Delhaes et al., 2012, Nagano et al., 2010). Aber auch der erhebliche Zeitaufwand für die Kultivierung mit einer Inkubationszeit von zwei bis vier Wochen stellt einen Nachteil dar (Bosshard, 2011, Morris et al., 1996). Zu den die Kultur-abhängigen Verfahren ablösenden Verfahren zählen die Denaturierungsgradientengelelektrophorese (denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE) (Cocolin et al., 2000, Muyzer et al., 1993), das Oligonukleotid DNA-Fingerprinting (oligonucleotide fingerprinting of ribosomal RNA genes, OFRG) (Valinsky et al., 2002), der terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (terminal restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Liu et al., 1997, Dickie et al., 2002) und die Sanger Sequenzierung (Sanger et al., 1977, Tedersoo et al., 2010). Die zur Zeit am Besten geeigneten Verfahren stellen jedoch Next Generation Sequencing (NGS) Technologien dar, die kostengünstiger, effektiver und schneller in der Speziesidentifikation sind. Zu diesen Hochdurchsatzverfahren gehört die Pyrosequenzierung (Margulies et al., 2005) von Roche 454, die Sequenzierung-durch-Synthese-Methode (sequencing-by-synthesis (SBS)-method) von Illumina (Balasubramanian, 2011) sowie die ligationsbasierte Methode (Sequencing by Oligo Ligation and Detection (SOLiD)) (Shendure et al., 2005) von Applied Biosystems.

1.6.1 Hochdurchsatzverfahren

Es gibt viele verschiedene Hochdurchsatzsequenzierungsplattformen, die in ihren Details differieren, aber typischerweise einem ähnlichen generellen Paradigma folgen: Templatepräparation, klonale Amplifikation, gefolgt von mehreren Zyklen massiver Parallelsequenzierung. Die spezifische Strategie, die von jeder Plattform verwendet wird, bestimmt die Qualität, Quantität und Verzerrung der resultierenden Sequenzierungsdaten, sowie die Nutzbarkeits der Plattform für spezielle Anwendungen. Die Plattformen von Illumina dominieren zurzeit mit ihren

Maschinen den Markt (Reuter et al., 2015). Basen werden hier ausgelesen unter Verwendung der Strategie des zyklischen reversiblen Abbruchs, der den Templatestrang Nukleotid für Nukleotid zyklusweise sequenziert. Das heißt in jedem Zyklus wird jeweils ein fluoreszenzmarkiertes Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) eingebaut, die Reaktion stoppt und das Fluoreszenzsignal wird detektiert, anschließend wird das Fluorophor und der terminierende Rest an der 3'-OH-Gruppe entfernt und die nächste Runde kann beginnen (Guo et al., 2008). Unter den Illumina Modellen sind die Gesamtfehlerraten $<1\%$, der häufigste Fehlertyp ist eine Substitution (Dohm et al., 2008). Der MiSeq ist ein schneller Sequenzierer mit Laufzeiten von bis zu vier Stunden und einem Durchsatz, der für zielgerichtete Sequenzierung und die Sequenzierung von kleinen Genomen gedacht ist (Reuter et al., 2015).

1.7 Ziel der Arbeit

Aufgrund der bislang bekannten Zusammenhänge zwischen Pilzen und CED ist Ziel dieser Arbeit das Mykobiom gesunder Individuen zu beschreiben. Hierdurch kann eine Grundlage gebildet werden, auf der in der Zukunft der Vergleich mit dem Mykobiom von CED-Patienten möglich sein wird und so weitere Rückschlüsse über den Einfluss von Pilzen in der Pathogenese gewonnen werden können. Um das Mykobiom zu beschreiben, muss zunächst eine Methode etabliert werden, um pilzliche DNA aus den gesammelten Stuhlproben zu extrahieren. Die DNA soll anschließend in einer PCR vervielfältigt werden, auf dem Illumina MiSeq sequenziert und die erhaltenen Daten mit geeigneten Methoden ausgewertet werden.

Kapitel 2

Methoden

2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau und Vorgehen

Es soll ein Hochdurchsatzverfahren entwickelt werden, das es ermöglicht aus humanen Stuhlproben pilzliche DNA zu gewinnen und diese so zu amplifizieren, dass die Proben schlussendlich mit Hilfe des Illumina MiSeq sequenziert werden können, um das gastrointestinale humane Mykobiom zu analysieren. Der erste Teil der Arbeit galt der Optimierung der Extraktion pilzlicher DNA aus humanen Stuhlproben. Durch die Variation der Mengen von Stuhl, β -Mercaptoethanol, Enzymen sowie Variation der eingesetzten Enzyme, Inkubationszeiten und Zeiten des mechanischen Zellaufbrechens sollte die Methode etabliert werden, die in einer PCR ein spezifisches Produkt liefert. Als Vergleich dienten Proben, die mit definierten Mengen einer Wildtyp-Hefe versetzt waren und somit definitiv pilzliche DNA enthielten.

Der zweite Teil der Arbeit galt der Optimierung der PCR selbst. Durch die Variation des PCR-Protokolls und des Maschinen-Protokolls sollte die PCR ermittelt werden, die ein spezifisches Produkt liefert und die besten Ergebnisse in der Sequenzierung mit dem MiSeq.

Der dritte Teil der Arbeit galt der praktischen Anwendung der beiden PCR-Modelle, die die besten Ergebnisse in Teil zwei erzielt hatten, um mit Hilfe der so gewonnenen Daten beide Methoden vergleichbar zu machen.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
β -Mercaptoethanol 99%	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
5x Phusion HF Buffer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
LE Agarosegel	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
DMSO 100%	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
dATP, dTTP, dCTP, d GTP	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Methanol 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MgCl ₂ 50mM	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
NaCl 0,9%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen/Fisher Scientific GmbH, Schwerte
RT-PCR Grade Water	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
5X Phusion HF Buffer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Trizma hydrochloride >99%	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Ethylenediaminetetraacetic acid >99%	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Rotiphorese 10x TAE Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.2.2 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Lysing Enzymes von <i>Trichoderma harzianum</i> lyophilized powder (Glucanex)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Lyticase von <i>Arthrobacter luteus</i> lyophilized powder	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

2.2.3 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Planegg) synthetisiert.

Primer	Sequenz
ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
ITS1F_MID-9 – MID-16	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXTAT GGTAATTGTCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
ITS2R	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
ITS2R_MID-X	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXXXAGTCAGTC AGCCGCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
ITS7F	5'-GTGAATCATCGAATCTTTG-3'
ITS7F_MID-1 – MID-4	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXTAT GGTAATTGTGTGAATCATCGAATCTTTG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS4_MID-D	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXXXXXXXAGTC AGCCTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

2.2.4 Geräte

Geräte und Zubehör	Hersteller
Sub-Cell Modell 96 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sub-Cell GT UV-transparent GelTray	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
GelCaster	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
26-well Comb	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific), Foster City, USA
Biometra Tgradient	Biometra GmbH, Göttingen
QIAcube	QIAGEN GmbH, Hilden
PowerBeadTubes Garnet 0,70mm	Dianova GmbH, Hamburg
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen (ThermoFisher Scientific), Eugene, USA
SpeedMill PLUS	Analytik Jena AG, Jena
Schüttelwasserbad GFL1086	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
VWR Mini Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Haushaltsmikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern
TKA X-CAD	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert
MiSeq	Illumina, San Diego, USA

2.2.5 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
QIAamp DNA Stool Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Qubit dsDNA BR Assay Kit 2-1000ng	Invitrogen/Fisher Scientific GmbH, Schwerte
SequalPrep Normalization Plate (96) Kit	Invitrogen/Fisher Scientific GmbH, Schwerte
KAPA Hifi HotStart ReadyMixPCR Kit (2x)	Kapa Biosystems, Wilmington, USA

2.2.6 Sonstiges

Sonstiges	Hersteller
DNA von <i>Candida tropicalis</i>	unbekannt
Mäusestuhl	Tanja Klostermeier
Wildtyp-Hefe	Bereitgestellt durch Prof. Dr. Frank Kempken, Abteilung für Botanische Genetik und Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2.3 Die Kohorten

Es wurden Stuhlproben aus vier verschiedenen Kohorten verwendet. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

2.3.1 Populationsbasierte Kontrollkohorte (BSP/SPC Kohorte)

Hierbei handelt es sich um eine norddeutsche Kontrollkohorte der Biobank Popgen mit über 2000 Teilnehmern, die überwiegend gesund sind. Zwischen 2005 und 2007 konnten 1317 Teilnehmer (Alter: 19–77 Jahre, 55% Männer) in die PopGen-Kontrollkohorte rekrutiert werden, davon 747 als Einwohnermeldeamtsstichprobe und 570 Blutspender. Die Basiserhebung umfasste einen Fragebogen, eine medizinische Untersuchung, die Sammlung von Blutproben sowie Ad-hoc-Analysen von Biomarkern und genetischen Faktoren. In jüngster Zeit wurde sie zu einer prospektiven Kohortenstudie mit dem Ziel weiterentwickelt, die zeitlichen Veränderungen bei entzündungsbasierten Biomarkern näher zu erforschen. Hierfür wurden ab 2010 alle Studienteilnehmer erneut eingeladen und zusätzlich Verzehrhäufigkeitsfragebögen eingesetzt, Urin- und Stuhlproben gesammelt sowie eine magnetresonanztomographische Erfassung der Fettgewebsverteilung angeboten. Der Responseanteil liegt derzeit bei circa 70% (Nothlings and Krawczak, 2012). Der Name BSP/SPC kommt von blood (donors) special phenotyped (BSP) und special phenotyped controls (SPC).

2.3.2 Kieler Kohorte zu CED (Kindred Kohorte)

Die Kindred-Kohorte ist eine Familienstudie und schließt Menschen mit einer CED ein sowie deren erkrankte und gesunde Geschwister, Halbgeschwister und leibliche Kinder ab sieben Jahren. Sie wird von der norddeutschen Biobank Popgen gemeinsam mit dem Institut für Epidemiologie, der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein und dem Institut

für Klinische Molekularbiologie durchgeführt. Zu Studienbeginn erfolgt eine Basisuntersuchung und zwei Jahre später eine Nachuntersuchung, bei denen jeweils ein Gesundheitsfragebogen ausgefüllt werden soll, sowie eine Blut- und eine Stuhlprobe abgegeben werden. Gefördert wird die Studie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (<https://www.epidemiologie.uni-kiel.de/forschung/familienstudie/> [Stand: 02.10.2017, 15:34]).

2.3.3 Food chain Plus Kohorte (FoCus Kohorte)

Diese Kohorte ist Teil eines Verbundprojektes des Kompetenznetzwerkes Food chain Plus. Im Rahmen dieses vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Netzwerkes wird untersucht, ob und wie bestimmte Ernährungsweisen und Nahrungsmittel mit Entzündungen im menschlichen Körper zusammenhängen. Sie startete 2010 unter der Koordination der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und arbeitet mit der Klinik für Innere Medizin 1 des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zusammen (<http://www.focus.uni-kiel.de/ueber-uns.html> [Stand: 02.10.2017, 15:54]).

2.3.4 PSC Kohorte

Diese Kohorte ist ebenfalls eine Substudie der Popgen-Datenbank und umfasst 790 bundesweit rekrutierte Probanden (Nothlings and Krawczak, 2012) mit autoimmunen Lebererkrankungen. Hierzu zählen neben der PSC auch die primär biliäre Cholangitis und die autoimmune Hepatitis. Für diese Arbeit wurden jedoch nur Patienten mit einer PSC verwendet.

2.4 Extraktion pilzlicher DNA

Das Labor des Comprehensive Center for Inflammation Medicine (CCIM) in Kiel etablierte bereits eine Methode um bakterielle DNA aus Stuhl zu gewinnen. Pilze besitzen jedoch eine anders aufgebaute Zellwand als Bakterien. Während die Zellwand der meisten Bakterien aus dem Peptidoglykan Murein besteht, setzt sich die pilzliche Zellwand aus Glukan, Chitin und Mannan zusammen. Aufgrund dessen war der erste Schritt in dieser Arbeit, eine geeignete Extraktionsmethode der pilzlichen DNA aus Stuhlproben zu entwickeln.

Ausgangspunkt für die Extraktion der pilzlichen DNA war das von Iliev et al. (2012) zur Verfügung gestellte Protokoll. In diesem wird eine kleine Spatelspitze mit Stuhl der jeweiligen Stuhlprobe zunächst in 160µl 50mM Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer), 40µl 1000U/ml Lyticase und 0,4µl 0,2% β -Mercaptoethanol suspendiert. Lyticase ist ein Enzym, das die β (1-3)-D-Glucose der Glykanschicht der Pilz-Zellwand hydrolysiert und β -Mercaptoethanol ist ein reduzierendes Reagenz, welches über Disulfidbrücken verbundene sowie kovalent verbundene Zellwandproteine löst. Dieser Schritt dient somit der Öffnung der pilzlichen Zellwände. Der Ansatz wird für 30min bei 37°C inkubiert und die pilzliche DNA über das QIAamp DNA Stool Mini Kit nach den Anweisungen des Herstellers isoliert.

Für die Auswertung der Extraktionsmethode der pilzlichen DNA bezüglich ihres Erfolges wird die so gewonnene DNA mittels PCR amplifiziert und die gewonnen Produkte mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und beurteilt. Die Ausführung dieser Schritte wird in

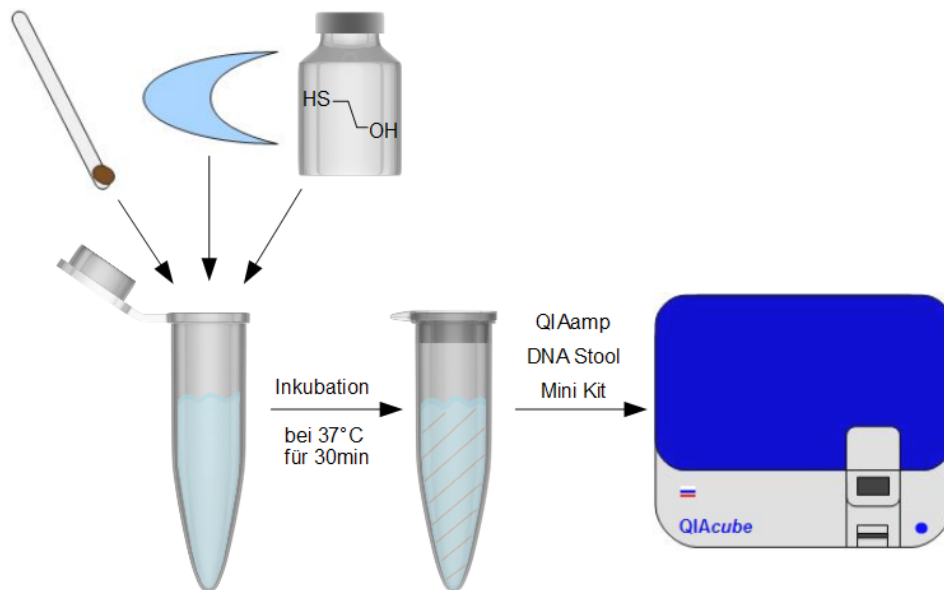


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau zur pilzlichen DNA-Isolation mit Extraktionsschritten. Zunächst werden eine Spatelspitze Stuhl, Lyticase (Enzymdarstellung als blauer Halbmond) und β -Mercaptoethanol (Reagenzdarstellung als Flasche mit chemischer Formel des β -Mercaptoethanol) in ein Tube gegeben. Dieses enthält bereits TE-Puffer. Anschließend folgt eine Inkubationsphase für 30min bei 37°C . Hiernach wird die Probe mithilfe des QIAamp DNA Stool Mini Kits im QIAcube weiterverarbeitet. Erstellung der Graphik mit Nutzung der Tubeillustrationen und einer Flaschenillustration der Bibliothek von <http://www.somersault1824.com/science-illustrations/>, Stand 25.10.2017, 16:56Uhr.

den folgenden Methoden-Teilen beschrieben. Die genauen Ergebnisse sowie die durchgeführten Veränderungen des Protokolls bis zur Etablierung einer endgültigen Version sind im Ergebnis-Teil aufgeführt.

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes. Die Vervielfältigung erfolgt in Zyklen mit jeweils drei Schritten. Zunächst kommt der Schritt der Denaturierung, um die Doppelstränge der DNA zu trennen. Anschließend folgt die Primerhybridisierung, in der sich die Primer an ihre komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge anlagern. Die Primer werden jeweils spezifisch für den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt designt und flankieren diesen. Im Design wird berücksichtigt, dass ein Primer komplementär zur flankierenden Sequenz sein muss. Außerdem spielt der GC-Gehalt sowie die Primer-Länge eine wichtige Rolle für die Schmelztemperatur des Primers. Darüber hinaus muss sicher gestellt werden, dass der Primer keine Sekundärstrukturen in sich ausbildet oder aber mit sich selbst oder dem anderen Primer hybridisiert. In der folgenden Phase, der Verlängerungsphase des Zyklus, werden die Primer mit Hilfe der DNA-Polymerase verlängert. Die Produkte dieses Zyklus dienen als Ausgangssequenzen für den nächsten Zyklus (Mülhardt, 2013).

Die meisten Studien fokussieren die 18S rRNA, die internal transcribed spacer (ITS) Regionen 1 und 2, die 5.8S rRNA und die 28S rRNA. Eine Darstellung dieser Regionen erfolgt in Abb. 2.2. Die rRNA ist ein gutes Ziel für eine PCR, da sie in bis zu 250 Kopien in jedem Ge-

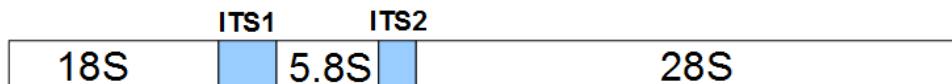


Abbildung 2.2: Struktur der nukleären rRNA-Gene und ihrer ITS-Regionen. Die Skalierung bezieht sich auf die für *S. cerevisiae* beschriebenen Größen in der GenBank. Ausnahme bildet die 5.8S-Region, die mit vierfacher Vergrößerung abgebildet ist um die Anschaulichkeit zu verbessern.

nom vorkommt und somit das Arbeiten mit Proben erleichtert, in denen die DNA-Konzentration gering ist (Vilgalys and Gonzalez, 1990). Des Weiteren eignet sich die rRNA gut, da sie hoch konservierte Regionen (18S-, 5.8S- und die 28S-Region) für die Primerhybridisierung enthält, sowie durch ihre schnelle Entwicklung variablere Regionen (ITS1 und ITS2) um Pilzspezies zu identifizieren (Nilsson et al., 2008, Khot et al., 2009). Die ITS-Region ist der 18S rRNA Gen-Region im Unterscheiden von Spezies überlegen, da sie eine klarer definierte Barodelücke besitzt, zudem liefert sie hohe Erfolgsraten in der PCR-Amplifikation (Schoch et al., 2012). Die Barodelücke bezieht sich auf das Nichtüberlappen der genetischen intra- und interspezifischen Varianz und ist wichtig für die Akkuratheit der Speziesidentifikation. Deswegen wurde die ITS-Region 2007 und 2012 als universeller genetischer Barcode der Pilze vorgeschlagen (Bellemain et al., 2010, Schoch et al., 2012). Sie besteht aus ITS1, 5.8S rRNA und ITS2 und variiert in ihrer Länge zwischen 450 und 800bp (Bellemain et al., 2010, Gardes and Bruns, 1993, Monard et al., 2013). Aufgrund von begrenzten Sequenzierleselängen bei Hochdurchsatzverfahren, werden meistens entweder ITS1 (Chehoud et al., 2015, Hoffmann et al., 2013) oder ITS2 (Liguori et al., 2016, Sokol et al., 2017) sequenziert. Mit Verbesserungen in der Sequenzieretechnologie wird sich dies ändern, doch aufgrund der möglichen Chimerenbildung, die typischerweise an hochkonservierten Regionen (Haas et al., 2011) wie der 5.8S-Region (Nilsson et al., 2015) erfolgt, wird man evtl. auch in Zukunft weiterhin ITS1 oder ITS2 wählen (Blaalid et al., 2013, Op De Beeck et al., 2014). Da sowohl die ITS1- als auch die ITS2-Region Argumente für und gegen ihren Einsatz als Zielsequenzen liefern, sie unterschiedliche Ergebnisse liefern und dies bislang größtenteils in Computersimulationen untersucht wurde, wurde für das zu entwickelnde Hochdurchsatzverfahren sowohl ein PCR-Protokoll für die ITS1- als auch die ITS2-Region entwickelt. So kann sich aufgrund der gewonnenen Daten nachvollziehbar für oder gegen eine Zielregion entschieden werden.

2.5.1 Etablierung der PCR

Aufgrund der Herausforderung ein spezifisches Produkt durch Vervielfältigung der jeweiligen Zielsequenz zu gewinnen, wurden verschiedene PCR-Protokolle auf unterschiedliche Arten variiert. Ansätze hierbei waren die optimale Annealingtemperatur der Primer zu ermitteln sowie die optimale Zyklusanzahl, die Variation der eingesetzten Primermenge, die Variation der eingesetzten Templatemenge sowie eine Variation der Mg^{2+} -Konzentration.

2.5.1.1 Die Annealingtemperatur

Die Annealingtemperatur spielt eine wichtige Rolle, da von ihr abhängt, ob der Primer zuverlässig mit der Template-DNA hybridisiert und in welchem Maße er Sekundärstrukturen bildet. Sie ist im wesentlichen abhängig von der Länge sowie der Zusammensetzung der Primer.

2.5.1.2 Die Zyklusanzahl

Ab einer gewissen Produktmenge (ca. 0,3-1pmol) kommt es zu einem Plateaueffekt, bei dem die Vermehrungsrate stark abnimmt. Dies hat verschiedene Gründe: Die Akkumulation von Endprodukten (DNA, Pyrophosphat) verlangsamt die Synthese, die Wahrscheinlichkeit des Reannealing zweier fertiger DNA-Stränge reduziert die Neusynthese, die Substratkonzentration nimmt ab, die Menge an intakter Polymerase nimmt ab, es kommt zur Konkurrenz mit unspezifischen Produkten (wie Primerdimeren) und zur verstärkten Fehlhybridisierung. In diesem Moment steigt die Zahl falscher Produkte und es wird ein Schmier in der Agarosegel-Elektrophorese sichtbar, da die falschen Produkte sich in ihrer Länge vom richtigen Produkt unterscheiden und somit ober- und unterhalb der richtigen Bande sichtbar werden (Mülhardt, 2013).

2.5.1.3 Die Primerkonzentration

Die Konzentration der Primer hat einen erheblichen Einfluss auf die Ausbeute der PCR. Bei zu wenigen, sowie zu hohen Konzentrationen sinkt die Ausbeute jeweils (Mülhardt, 2013).

2.5.1.4 Die Templatekonzentration

In der Praxis werden wenigstens 10.000 Template-DNAs benötigt, um problemlos zu amplifizieren. 100.000 Moleküle Template-DNA entsprechen ca. 300ng menschlicher genomischer DNA. Der Einsatz von zu viel Template-DNA erhöht die Wahrscheinlichkeit für ein Fehlannealing und die Reaktion kann zu früh in die Sättigung geraten (Mülhardt, 2013).

2.5.1.5 Die Magnesiumkonzentration

Mg^{2+} beeinflusst Primerannealing, die Trennung der Stränge bei der Denaturierung, die Produktspezifität, die Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate. Außerdem benötigt die DNA-Polymerase für ihre Aktivität freie Mg^{2+} -Ionen. Weil Primer, Nukleotide und eventuell vorhandenes Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Mg^{2+} wegfangen, muss eigentlich für jede PCR die optimale Mg^{2+} -Konzentration ermittelt werden – sie liegt normalerweise zwischen 0,5 und 2,5mM (Mülhardt, 2013).

2.5.2 Etablierung der PCR für die ITS1-Region

Zunächst wurde das Protokoll, welches von Iliev et al. (2012) verwendet wurde, genutzt. Es ist in Tabelle 2.1 näher beschrieben. Abb. 2.3 zeigt das verwendete Primerpaar ITS1f und ITS2 und deren Anlagerungspunkte an der rRNA schematisch.

Da dieses Protokoll zunächst nur ein spezifisches Produkt der Positivkontrolle zur Darstellung brachte, wurde das Protokoll auf verschiedene Arten variiert und Alternativ-Protokolle getestet,

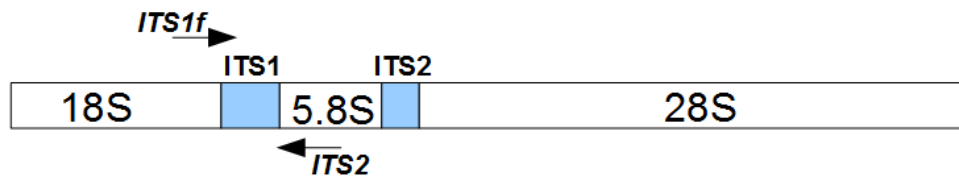


Abbildung 2.3: Spezifische Bindestellen im Rahmen der Primerhybridisierung zur Vervielfältigung der ITS1-Region. Dargestellt sind die nukleären rRNA-Gene und ihre ITS-Regionen mit einer schematischen Lokalisation der Primer ITS1f und ITS2, welche die ITS1-Region einschließen. Die Größenverhältnisse sind auf die für *Saccharomyces cerevisiae* beschriebenen Größen in der GenBank skaliert mit Ausnahme der 5.8S-Region. Diese ist zur besseren Anschaulichkeit mit vierfacher Vergrößerung abgebildet.

Tabelle 2.1: Darstellung des PCR-Protokolls für ITS1 von Iliev et al. (2012) mit dem dazugehörigen Maschinen-Protokoll

Substanz	Volumina in μl
PCR-grade- H_2O	4,25
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix	6,25
Primer ITS1f	0,5
Primer ITS2	0,5
Template DNA	1

Maschinen-Protokoll (35 Zyklen)

- | | | | |
|----|----|----------|---------------|
| 1. | 95 | 3min | } $\times 35$ |
| 2. | 98 | 20s | |
| 3. | 55 | 30s | |
| 4. | 72 | 2min | |
| 5. | 72 | 10min | |
| 6. | 4 | ∞ | |

bis schlussendlich ein geeignetes PCR-Protokoll etabliert werden konnte. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt.

2.5.3 Etablierung der PCR für die ITS2-Region

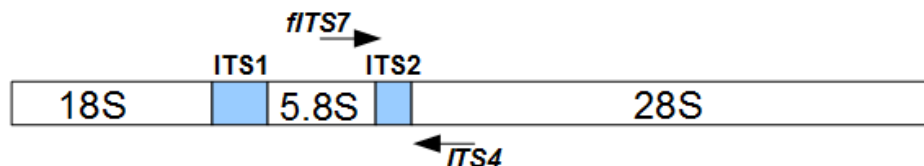


Abbildung 2.4: Spezifische Anlagerungsregionen der Primer an den nukleären rRNA-Genen zur Vervielfältigung der ITS2-Region. Aufgetragen sind die nukleären rRNA-Gene einschließlich derer ITS-Regionen mit den die ITS2-Region einschließenden fITS7- und ITS4-Primern. Die Größenverhältnisse sind auf die für *Saccharomyces cerevisiae* beschriebenen Größen in der GenBank skaliert. Nur die 5.8S-Region ist mit vierfacher Vergrößerung abgebildet, um die Anschaulichkeit zu verbessern. Die Anlagerungspunkte der Primer sind schematisch aufgetragen.

Für die PCR mit der ITS2-Zielsequenz wurde das PCR-Protokoll, welches durch Ihrmark et al. (2012) beschrieben wurde, genutzt. Das Protokoll ist inklusive des Maschinen-Protokolls

in Tabelle 2.2 näher beschrieben. Die verwendeten Primer und deren Anlagerungspunkte an der rRNA sind in Abb. 2.4 schematisch dargestellt.

Tabelle 2.2: PCR-Protokoll für ITS2 nach Ihrmark et al. (2012) mit dem dazugehörigen Maschinen-Protokoll

Substanz	Volumina in μl
PCR-grade-H ₂ O	13
5x buffer	5
dNTP mix 10mM	0,5
Taq-Polymerase	0,5
Primer ITS4	1
Primer ITS7F	1
Template DNA	4

Maschinen-Protokoll (25 Zyklen)

1.	94	5min	
2.	94	30s	} $\times 25$
3.	57	30s	
4.	72	30s	
5.	72	7min	
6.	4	∞	

Dieses PCR-Protokoll zeigte nur ein spezifisches Produkt der Positivkontrolle, weswegen das Protokoll einer Modifizierung unterzogen wurde. Die näheren Ergebnisse und das schlussendlich etablierte Protokoll sind im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben.

2.6 Konzentrationsmessung

Für die Messung der DNA-Konzentration einer Probe wurde das Qubit 2.0 Fluorometer mit dem Qubit dsDNA BR Assay Kit 2-1000ng genutzt und nach Anweisungen des Herstellers verfahren.

2.7 Die Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist ein Verfahren um RNA und DNA ihrer Stranglänge nach aufzutrennen und ihre Länge über einen Vergleich mit Strängen von bekannter Länge zu bestimmen. Für die Auftrennung werden die Moleküle durch das Anlegen eines elektrischen Feldes gezwungen durch ein Netz zu wandern, welches aus vernetzten Agarosepolymeren gebildet wird. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren des Netzes. Da kleine Moleküle schneller entlang des elektrischen Gradienten wandern können, ist es möglich RNA und DNA ihrer Stranglänge nach entsprechend aufzutrennen.

In dieser Arbeit wurde ein Gel mit einer Konzentration von 2% Agarose verwendet. Für dessen Herstellung wurden 2g Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) bis zur 100ml-Marke aufgefüllt. Diese Mischung wurde im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde das Agarosegel

auf ca. 60°C abgekühlt und mit 1,8µl Sybr Safe versetzt. Sybr Safe ist ein Nukleinsäurefarbstoff, der sich an DNA und RNA anlagert und unter Blaulicht und UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Nach Durchmischung wurde das Gel in eine Gelkammer mit zwei 26 Zinken-Kämmen gegossen und war nach 30min erkaltet, so dass die Kämmen entfernt werden konnten. Das Gel wurde anschließend in die Elektrophorese-Kammer gelegt, welche mit TE-Laufpuffer gefüllt war. Bevor die Proben aufgetragen werden konnten, wurden zu je 2µl einer Probe 8µl Ladepuffer pipettiert. Der Ladepuffer stabilisiert den pH-Wert der Probe und erhöht deren Dichte, so dass die Proben in die Taschen sinken und nicht hindurchdiffundieren können. Anschließend wurden die Proben gevortext, zentrifugiert und jeweils die ganzen 10µl aufgetragen. Um die Stranglänge nach Ablauf der Elektrophorese bestimmen zu können, wurde in jeweils eine Tasche pro Reihe 2µl einer 1000 Basenpaaren DNA-Leiter pipettiert. Die DNA-Leiter ist eine Mischung verschiedener DNA-Stränge bekannter Länge. Diese dienen aufgetrennt zum Längenvergleich mit den Fragmentstücken der Proben. Nachdem das Gel beladen war, wurde die Kammer geschlossen und eine Spannung von 440V angelegt. Nach einer Laufzeit von 45 Minuten waren die Proben aufgetrennt und konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die spezifischen Produkte der Amplifikation der ITS1-Region liegen bei einer Länge zwischen 100 und 800bp mit einer durchschnittlichen Länge von 257bp (Motooka et al., 2017), bzw. 183bp (Nilsson et al., 2008). Unterschiedliche durchschnittliche Längenangaben der ITS-Regionen können z.B. durch die jeweilig genutzten Primer und deren Bindungsorte begründet sein. Die spezifischen Produkte der Amplifikation der ITS2-Region liegen bei einer Länge zwischen 122 und 245bp (Ihrmark et al., 2012). Die durchschnittliche Länge beträgt 173bp (Nilsson et al., 2008). Die Längenvarianz und somit eine Darstellung verschiedener spezifischer Produkte in der Agarosegel-Elektrophorese bedingt sich durch die interspezifischen genomischen Unterschiede.

2.8 Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung

Für die weitere Sequenzierung der erhaltenen DNA-Fragmente mussten die Proben zunächst vorbereitet werden. Hierfür erfolgte zunächst eine Normalisierung der Konzentrationen der einzelnen Proben. Diese wurde mit dem SequelPrep Normalization Plate (96) Kit nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Es folgte die Konzentrationsbestimmung der Proben wie in 2.6 beschrieben. Da in jeden Pool vier 96-well PCR-Platten einfließen, bzw. die darin enthaltenen Proben, folgte zuletzt die Berechnung der benötigten Volumina der einzelnen Proben. Dies war wichtig um zu garantieren, dass alle Proben in gleichen Konzentrationen im endgültigen Pool enthalten sind.

2.9 Sequenzierung im Illumina MiSeq

Das Prinzip der sich auf dem Markt befindenden Hochdurchsatzsequenzierungsplattformen inkl. des hier verwendeten Illumina MiSeq wurde bereits in der Einleitung dieser Arbeit zugrunde gelegt. Die Sequenzierung erfolgte jeweils nach Anweisungen des Herstellers im NGS-Labor des Instituts für klinische Molekularbiologie.

2.10 Prozessierung der Rohdaten der Sequenzierung

Die Datenprozessierung erfolgt in mehreren Schritten und wurde in Kooperation mit Malte Christoph Rühlemann am Institut für klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

2.10.1 Trimming: Kürzen der Sequenzen

Ausgelesene Sequenzierungen können am 3'- oder 5'-Ende eine abnehmende Qualität aufweisen, die die weitere Datenauswertung negativ beeinflusst. Deshalb sollten diese Bereiche detektiert und entfernt werden. Für das Trimmen der ausgelesenen Sequenzen wurde das Programm Sickle mit Standardeinstellungen und einer minimalen Sequenzlänge von 150bp nach dem Trimmen verwendet. Das heißt, dass Sequenzen, die bei der Bearbeitung in diesem Programm auf eine Länge unterhalb des festgelegten Grenzwertes von 150bp gekürzt wurden, vom Programm verworfen wurden.

2.10.2 Stitching

Für das Zusammenfügen der Vorwärts-Reads (forward read, FWD-Read) und der Rückwärts-Reads (reverse read, REV-Read) wurde das Programm Vsearch v2.4.3 verwendet, so dass Sequenzen mit einer minimalen Länge von 200bp und maximalen Länge von 550bp entstanden. Aufgrund der bereits erwähnten stark variierenden Längen der ITS-Regionen kann es jedoch vorkommen, dass die maximale Länge von 550bp nicht ausreicht. Bei zu großen Amplicons, in denen die FWD- und REV-Reads nicht überlappten, wurde daher nur der FWD-Read mitgeführt. Auch die minimale Länge der Sequenzen spielt eine wichtige Rolle. Zu niedrige minimale Leselängen führen zu unoptimalen Clusterprozessen, da die Sequenzen nicht polymorph genug sind. So führte eine minimale Leselänge von 100bp dazu, dass bei Monard et al. (2013) zwei OTU's in verschiedenen Clustern platziert wurden, obwohl sie identisch waren.

2.10.3 Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle sorgt für eine Auswahl der Rohdaten, die ein hohes Maß an Sequenziergenauigkeit erfüllen. Eine Rohdatei wird im FASTQ-Format gespeichert und kann so aussehen:

```
@M03511:89:000000000-AUJ9P:1:2106:19486:1750 1:N:0:CTAGTCGA+CGTTGGAT
AACGCAAATTGCGCCCGTTGGTATTTTCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCC
CCCGGTTTGGTGTAGGGCGTATGCTCGGTGTGTTTTGGAGAATTCGACGTCGGGACTTGTGTTGTAGT
GAATTAGGAGCCTCCGGTTAGCCTATATTGCTACGGTCGACCGCAAATTGTTCCATTATTTTCCCATC
AAATCTGGCAGGGCTCCCCCGTAACTTTTCGAATTTCTCAATACTCCCAGGGTGTACACCTTCTCTAC
TAAGTCTCTTCCGCGCACCTTCTCGTA+8A6AC+@EFGGGGG7=FEGFFGF;CC,CC9CC,CFEFE
FFGFGGFGGGGGGGGFCFGFGGGGGGF,BF6@+8@FFFECE,,<:C,++74=AF,+888BB4,,+,+9
,:4:59+98+++++3+3:C,8,B,:38<,,,CD,,C,,+,+,5<++8++,33@,,,7,,,,*6@6**
*1*1=C*3,,,3,6,7,,,27,,82,?,;,<,,+*****13=*****/:**/+++2/**02+3+++
3<++003*0**1*****3*2002+3+++3++200+++2++/())**/:60/2*0)
```

In der ersten Zeile befindet sich hinter dem „@“ die dem Read vom Illumina MiSeq zugeordnete Identifikationsbezeichnung. Hiernach folgt die ausgelesene Sequenz selbst, in diesem Fall von Zeile zwei bis sechs. Anschließend folgt ein „+“, das optional von der gleichen Identifikationsbezeichnung wie in Zeile eins gefolgt ist. In den darauf folgenden Zeilen befindet sich der Phred-Qualitätsscore jedes Nukleotids der Sequenz, in diesem Fall von Zeile acht bis zwölf. Er wird jeweils durch ein einziges Zeichen des American Standard Code for Information Interchange (ASCII) kodiert. Der Phred-Qualitätsscore ist dementsprechend genauso lang wie die Sequenz. Der Phred-Qualitätsscore reicht im Phred+33-Format, welches von neueren Illumina-Modellen genutzt wird, von 0 bis 40. Die Werte werden von den ASCII-Zeichen 33 bis 73 kodiert. Wenn einer Base ein Wert von 30 zugeordnet wird, der über den ASCII als „?“ verschlüsselt würde, ist dieser Wert äquivalent mit der Wahrscheinlichkeit einer inkorrekten Basenbenennung in 1 von 1000 Malen. Also wurde die Base zu 99,9% korrekt ausgelesen. Bei einem Phred-Qualitätsscore von 20 sind dies 99%, die Wahrscheinlichkeit einer inkorrekten Basenbenennung liegt bei 1 von 100 Malen. Dementsprechend wird in diesem Fall jede 100bp lange Sequenz eine fehlerhafte Base enthalten (https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf [Stand 06.07.2017, 15:34]). Der Phred-Qualitätsscore ist also wichtig zur Beurteilung der Akkuratheit der Sequenzierungsdaten. In dieser Arbeit wurden im Rahmen der Qualitätskontrolle Sequenzen aus dem Datensatz entfernt, wenn 90% der Nukleotide einen Qualitätswert von 20 nicht unterschritten haben. Darüber hinaus wurden Sequenzen aus dem Datensatz entfernt, wenn sie einen erwarteten Fehler von 1 überschritten. Der erwartete Fehler einer Sequenz wird mit Hilfe der Phred-Qualitätsscores der Basen der Sequenz ermittelt. So gelingt eine Annäherung an die Anzahl der inkorrekt ausgelesenen Basen einer Sequenz. Durch den Grenzwert von 1 soll somit verhindert werden, dass die Anzahl der falsch ausgelesenen Basen einer Sequenz >1 ist.

2.10.4 Chimären-Entfernung

Chimäre Sequenzen sind hybride Produkte unterschiedlicher Sequenzen, die im Rahmen der PCR entstehen können. Sie können fälschlicherweise als neue Organismen interpretiert werden und somit die Diversität verfälschen. Deshalb wurden chimäre Sequenzen mithilfe der `-uchime_denovo`-Funktion von Vsearch entfernt.

2.10.5 Taxonomische Klassifizierung

Zur Taxonomischen Klassifizierung der bearbeiteten Sequenzen wurde der SINTAX Algorithmus in Usearch v9 genutzt. Hierbei werden die Sequenzen in kleinere Stücke der Größe k zerlegt. Diese werden „k-mere“ genannt analog zu Di- und Trimeren bei $k=2$, bzw. $k=3$. Anschließend werden die k-mere gegen eine Datenbank verglichen. Werden alle k-mere einer Sequenz in diesem Vergleich immer derselben Spezies zugeordnet, liefert der Vergleich also immer dasselbe Ergebnis, entspricht dies einer Annotationskonfidenz von $1 = 100\%$ und somit einer eindeutigen taxonomischen Zuordnung. Eine Annotationskonfidenz von $0,5 = 50\%$ würde bedeuten, dass die k-mere einer Sequenz in 50% der Gattung A und in 50% der Gattung B zugeordnet werden. Es würden folglich beide Gattungen eine Annotation mit $0,5 = 50\%$ erhalten. In diesem Fall ist es sinnvoll einen erneuten Vergleich eine Ebene höher durchzuführen, also in diesem Fall auf

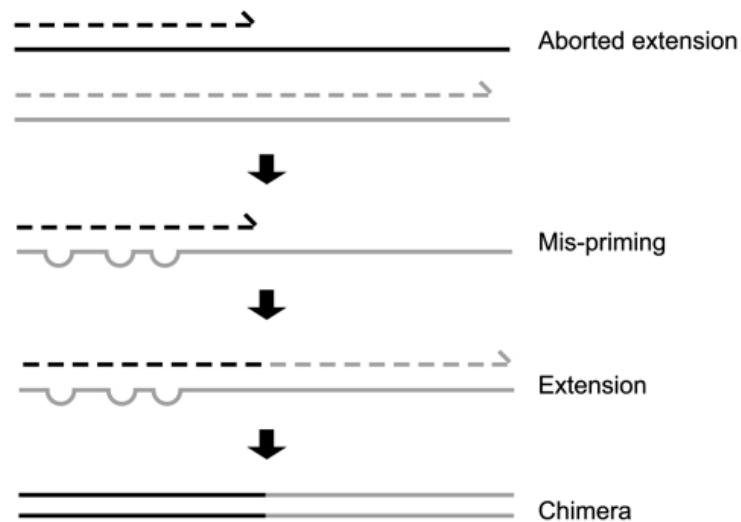


Abbildung 2.5: Entstehung einer chimären Sequenz während einer PCR nach Haas et al. (2011). Ein abgebrochenes Verlängerungsprodukt eines früheren Zyklus der PCR kann als Primer in einem folgenden PCR-Zyklus funktionieren. Wenn sich dieses abgebrochene Verlängerungsprodukt an eine unpassende Matrize anlagert und als Primer fungiert, entsteht eine Chimäre.

Familienebene. Werden nun alle k-mere derselben Familie zugeordnet, ergibt sich eine Annotationskonfidenz von $1 = 100\%$ und man erhält eine eindeutige Zuordnung. In dieser Arbeit wurde der Annotationsgrenzwert auf 0,8 gesetzt. Als Datenbank für den Vergleich diente die auf der Homepage von Usearch (drive5.com) zur Verfügung gestellte Version der UNITE Datenbank (unite.ut.ee). Abundanztabellen wurden auf allen taxonomischen Ebenen von Domäne bis Spezies erstellt. Konnte eine Sequenz nicht auf der jeweiligen Ebene klassifiziert werden, so wurde die feinstmögliche Klassifizierung einer darüber liegenden Ebene als Annotation zugewiesen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Extraktion der pilzlichen DNA aus Stuhl

Die zunächst durchgeführte Extraktion pilzlicher DNA aus Stuhl nach dem von Iliev et al. (2012) zur Verfügung gestellten Protokoll zeigte nach Durchführung der PCR mit der ITS1-Zielregion ein spezifisches Produkt der Positivkontrolle *Candida tropicalis* in der Agarosegelelektrophorese. Für die zu untersuchenden Proben konnte jedoch kein spezifisches Produkt nachgewiesen werden. Für eine Optimierung des Extraktionsprotokolls wurden daher nachfolgend verschiedene Ansätze gewählt, die in Tabelle 3.1 zusammengefasst sind. Alle veränderten Schritte wurden dabei vor der DNA-Isolation über das QIAamp DNA Stool Mini Kit vorgenommen. Die DNA-Isolation mit dem Kit wurde dann immer nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden die eingesetzten Mengen von β -Mercaptoethanol (von 0,4 μ l auf 2,2 μ l) und der Lyticase (von 40 μ l auf 220 μ l) erhöht sowie die Inkubationszeit auf 90min verlängert. Um sicherzugehen, dass die Extraktion nicht aufgrund einer zu geringen Pilzzellkonzentration in der Probe fehlschlägt, wurden hierbei vier der fünf Proben mit verschiedenen Mengen (1 μ l, 5 μ l, 10 μ l und 100 μ l) einer Hefelösung versetzt (Tabelle 3.1, Versuch 1). Die Veränderung des Versuchsansatzes in dieser Weise zeigte jedoch keine Verbesserung der DNA-Extraktion. Daraufhin wurden dem Versuchsansatz unterschiedliche Mengen an hydrolytischen Enzymen zugefügt (Tabelle 3.1, Versuch 2). Der erste Ansatz enthielt eine auf 440 μ l erhöhte Menge Lyticase, der zweite Ansatz enthielt anstelle der Lyticase 40 μ l Glucanex (40mg/dl) von *Trichoderma hazanum*. Dieses Enzym hydrolysiert ebenfalls die β (1-3)-D-Glucose der Glykanschicht der pilzlichen Zellwand. Der dritte Ansatz enthielt eine Kombination beider Enzyme in den angegebenen Mengen. Alle drei Ansätze wurden mit je einer Spatelspitze Stuhl, einer Spatelspitze Stuhl mit Zugabe von 100 μ l Hefelösung oder 100 μ l Hefelösung angesetzt. Zudem wurden die Ansätze in vierfacher Ausführung angesetzt: Zwei der Ausführungen wurden bei 37°C für 90min inkubiert und die anderen beiden Ausführungen bei 37°C über Nacht. Anschließend wurde eine für 90min und eine über Nacht inkubierte Ausführung bei dem Bearbeitungsschritt mit der SpeedMill PLUS im QIAamp DNA Stool Mini Kit für entweder wie im Protokoll gefordert 45s behandelt oder für 20min. Die SpeedMill PLUS ist ein System zum Homogenisieren, bzw. für die mechanische Zerkleinerung unterschiedlichster Ausgangsmaterialien als Basis für eine nachfolgende Isolierung und Aufreinigung von DNA, RNA oder Proteinen (<http://www.analytik-jena.de/de/life->

science/produkte/prod/cat/homogenisieren/prod/speedmill-plus.html [Stand 28.12.2017, 15:17]).

Dieses Gerät schließt die Zellen mechanisch auf. Bei diesem Versuch zeigten nur die mit Hefe versetzten Proben nach der PCR in der Agarosegelelektrophorese spezifische Produkte. Es gab keine Unterschiede bedingt durch die unterschiedlichen Inkubationszeiten oder die unterschiedlichen Bearbeitungszeiten mit der SpeedMill PLUS. In einem nachfolgenden Versuch wurden die Mengen der eingesetzten Enzyme auf 440µl Lyticase und 44µl Glucanex

Tabelle 3.1: Übersicht über die durchgeführten Versuchsreihen mit den jeweils variierten Reagenzien und Bearbeitungsschritten (Teil 1).

Reagenzien und Bearbeitungsschritte	Protokoll nach Iliiev et al. (2012)	Versuch 1	Versuch 2.1 je 4 Ansätze	Versuch 2.2 je 4 Ansätze	Versuch 2.3 je 4 Ansätze	Versuch 3.1	Versuch 3.2
Hefelösung [µl]	-	- 1 5 10 100	Versuche mit 3 Varianten je Ansatz: 1 Spatelspitze Stuhl ODER 1 Spatelspitze Stuhl + 100µl Hefelösung ODER 100µl Hefelösung			Versuche mit 5 Varianten: 1 Spatelspitze Stuhl ODER 1 Spatelspitze Stuhl + 50µl Hefelösung ODER 50µl Hefelösung ODER 2 Spatelspitzen Stuhl ODER 2 Spatelspitzen Stuhl + 50µl Hefelösung	
Stuhl, human [Anzahl der Spatelspitzen]	1	1					
Stuhl, Maus [Anzahl der Spatelspitzen]	-	-	-			-	
Stuhl direkt aus dem Kolon entnommen, Maus [Anzahl der Spatelspitzen]	-	-	-			-	
TE-Puffer 50mM/1mM [µl]	160	880	560	960	520	616	396
99% β-Mercapto-ethanol [µl]	0,4	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
Lyticase 1000U/ml [µl]	40	220	440	-	440	440	660
Glucanex 40mg/dl [µl]	-	-	-	40	40	44	-
Glucanex 75mg/dl [µl]	-	-	-	-	-	-	44
100% Methanol [µl]	-	-	-	-	-	-	-
0,9% NaCl-Lösung [µl]	-	-	-	-	-	-	-
Inkubationszeit bei 37°C [min]	30	90	Versuche mit jeweils 4 Ansätzen: Hiervon 2 Ansätze mit 90min Inkubation und 2 Ansätze mit Inkubation über Nacht			90	90
Bearbeitungszeit in der SpeedMill PLUS [s]	45	45	Versuche mit jeweils 4 Ansätzen: 1 Ansatz mit 90min Inkubation und 1 Ansatz mit Inkubation über Nacht → Bearbeitungszeit 45s 1 Ansatz mit 90min Inkubation und 1 Ansatz mit Inkubation über Nacht → Bearbeitungszeit 20min			45	45

(40mg/ml) sowie 660µl Lyticase und 44µl Glucanex (75mg/ml) erhöht, die Inkubationszeit betrug 90min bei 37°C (Tabelle 3.1, Versuch 3). Jedoch zeigte auch dieser Versuchsansatz keine spezifischen PCR-Produkte in der Agarosegelelektrophorese. Da in der verfügbaren Literatur oftmals mit Mäusekot gearbeitet wird, der in Menge und Zusammensetzung der enthaltenen Pilze nicht dem menschlichem Stuhl entspricht, wurde eine Versuchsreihe mit Mäusekot angesetzt. Hierfür wurden im ersten Ansatz 440µl Lyticase verwendet, im zweiten Ansatz 40µl Glucanex (75mg/dl), im dritten Ansatz 660µl Lyticase und 44µl Glucanex (75mg/dl) und im vierten Ansatz ebenfalls 660µl Lyticase und 44µl Glucanex (75mg/dl (Tabelle 3.2, Versuch 4). In diesem letzten Ansatz wurde jedoch die eingesetzte Kotmenge von einer Spatelspitze auf zwei Spatelspitzen Kot erhöht. Jeder dieser Ansätze wurde doppelt angesetzt. Der in dieser Versuchsreihe eingesetzte Mäusekot bestand in der einen Ansatzvariante aus normal defäkiertem Kot und in der anderen Ansatzvariante aus direkt aus dem Kolon entnommenem Kot. Die Inkubationszeit blieb weiterhin auf 90 min bei 37°C erhöht, es konnte jedoch abermals kein spezifisches PCR-Produkt nach der Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Die erste Verbesserung wurde

Tabelle 3.2: Übersicht über die durchgeführten Versuchsreihen mit den jeweils variierten Reagenzien und Bearbeitungsschritten (Teil 2).

Reagenzien und Bearbeitungsschritte	Versuch 4.1	Versuch 4.2	Versuch 4.3	Versuch 4.4	Versuch 5	Versuch 6	Versuch 7
Hefelösung [µl]	-	-	-	-	-	-	-
Stuhl, human [Anzahl der Spatelspitzen]	-	-	-	-	1	1	1
Stuhl, Maus [Anzahl der Spatelspitzen]	Versuche mit jeweils 2 Ansätzen: 1 Spatelspitze Mäusekot ODER 1 Spatelspitze Mäusekot direkt aus dem Kolon entnommen (Versuch 4.4 mit jeweils 2 Spatelspitzen)				-	-	-
Stuhl direkt aus dem Kolon entnommen, Maus [Anzahl der Spatelspitzen]					-	-	-
TE-Puffer 50mM/1mM [µl]	560	960	396	396	396	396	900
99% β-Mercapto- ethanol [µl]	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2 5 7,5 10 12,5	5 10 12,5	-
Lyticase 1000U/ml [µl]	440	-	660	640	660	660	-
Glucanex 40mg/dl [µl]	-	-	-	-	-	-	-
Glucanex 75mg/dl [µl]	-	40	44	44	44	44	-
100% Methanol [µl]	-	-	-	-	-	-	20
0,9% NaCl-Lösung [µl]	-	-	-	-	-	-	80
Inkubationszeit bei 37°C [min]	90	90	90	90	90	90	90
Bearbeitungszeit in der SpeedMill PLUS [s]	45	45	45	45	45	45	45

in einer Versuchsreihe erzielt, in der schrittweise die β-Mercaptoethanol-Volumina erhöht worden waren. Dies geschah mit der Intention, durch erhöhte Zugabe des Agens, das die über Disulfidbrücken verbundenen sowie kovalent verbundenen Zellwandproteine löst, dessen Wirkung zu erhöhen und somit den genutzten Enzymen eine größere Angriffsfläche an der Glykanschicht der Pilz-Zellwand bieten zu können. Die eingesetzten Volumina betrugen je 2,2µl, 5µl, 7,5µl, 10µl und 12,5µl β-Mercaptoethanol (Tabelle 3.2, Versuch 5). Zusätzlich wurden je 660µl Lyticase und 44µl Glucanex (75mg/ml) verwendet. Die Inkubationszeit blieb weiterhin auf 90min bei 37°C erhöht. Die so erhaltenen Produkte nach der PCR der isolierten DNA sind in Abb. 3.1 gezeigt. Ein weiterer Ansatz, der ein spezifisches Produkt der Proben nach der Agarosegelelektrophorese zeigte (Abb. 3.1, Versuch 7), bestand aus 900µl TE-Puffer, 20µl Methanol und 80µl 0,9%-NaCl (Abb. 3.1, Versuch 7). Hierin wurden die Proben suspendiert und anschließend 90min lang bei 37°C inkubiert.

Nachfolgend sollte verifiziert werden, welche Methode zur DNA-Isolierung am effektivsten ein spezifisches Produkt nach der PCR liefert. Hierzu erfolgte als nächstes eine Versuchsreihe, bei der der erste Ansatz 5 µl β-Mercaptoethanol, der zweite Ansatz 10 µl β-Mercaptoethanol und der dritte Ansatz 12,5 µl β-Mercaptoethanol enthielt, sowie jeweils noch 660 µl Lyticase und 44 µl Glucanex (75 mg/dl) (Tabelle 3.2, Versuch 6). Der vierte und der fünfte Ansatz enthielten 900 µl TE-Puffer, 20 µl Methanol und 80 µl 0,9% NaCl (Tabelle 3.2, Versuch 7). Diese Versuchsreihe wurde mit fünf verschiedenen Stuhlproben durchgeführt. Abb. 3.2 zeigt die aufgetragenen spezifischen Produkte dieser Proben nach Durchlauf einer nested-PCR. Der

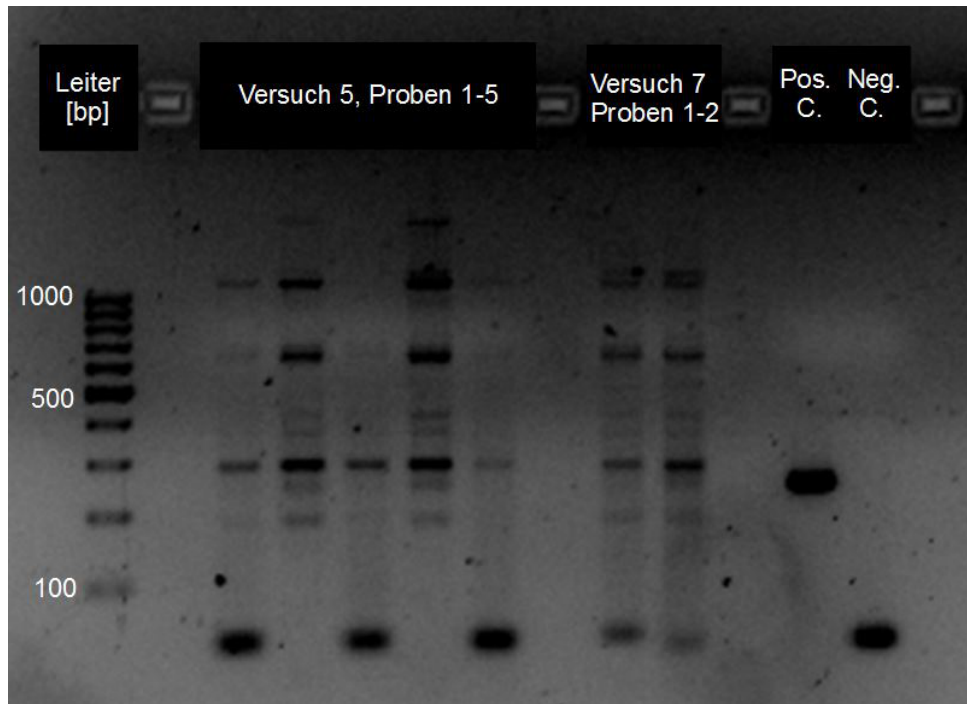


Abbildung 3.1: Ergebnisse der Optimierung von Extraktionsmethoden für Pilz-DNA aus Stuhlproben. Die erste Spur enthält eine 1000bp DNA-Leiter. Sie enthält DNA-Stränge bekannter Längen und dient als Komigrationsstandard. Anschließend folgen fünf Proben des Versuches 5 (siehe Tabelle 3.2), der in der Extraktion unterschiedliche β -Mercaptoethanol-Volumina nutzte. Rechts hiervon folgen zwei Proben des Versuches 7 (siehe Tabelle 3.2), der in der Extraktion anstelle von Enzymen Methanol und 0,9%-NaCl nutzt. Anschließend ist die Positivkontrolle „Pos.C.“ mit DNA von *C. tropicalis* aufgetragen. Zuletzt folgt die Negativkontrolle „Neg.C.“, für welche PCR-H₂O verwendet wurde.

Sprung zu einer nested-PCR liegt hier darin begründet, dass die Agarosegelelektrophorese zu einem späteren Zeitpunkt nach vielen zwischenzeitlich durchgeführten Versuchen durchgeführt wurde.

Nachdem ein PCR-Protokoll etabliert werden konnte, erfolgte ebenfalls ein Testlauf mit einigen Proben, die bereits lediglich mit dem QIAamp DNA Stool Mini Kit bearbeitet waren, welches normalerweise auf die Extraktion bakterieller DNA ausgelegt ist. Auch hier konnte ein spezifisches Produkt erzielt werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass eine große Herausforderung bei der Etablierung eines Extraktionsverfahrens für die pilzliche DNA darin lag, dass es schwierig war zu beurteilen, ob die nicht erfolgte Darstellung der von uns bearbeiteten Proben ihre Ursache in einer verbesserungswürdigen PCR oder Extraktionsmethode hat. Da die getesteten PCR-Verfahren in der Lage waren, die Gene der Positivkontrolle zu vervielfältigen, war die Durchführung der erfolgten Versuchsreihen notwendig. Zuletzt entschlossen wir uns als Extraktionsverfahren die Methode der DNA-Isolation lediglich über das QIAamp DNA Stool Mini Kit zu nutzen. Dieser Entschluss erfolgte aus mangelnder Überlegenheit der hier neu entwickelten Extraktionsverfahren. Zudem spielten auch die Faktoren Kosten und Zeit eine Rolle, da bereits alle Stuhlproben der Kohorten mit dem QIAamp DNA Stool Mini Kit für Untersuchungen des Mikrobioms bearbeitet vorlagen.

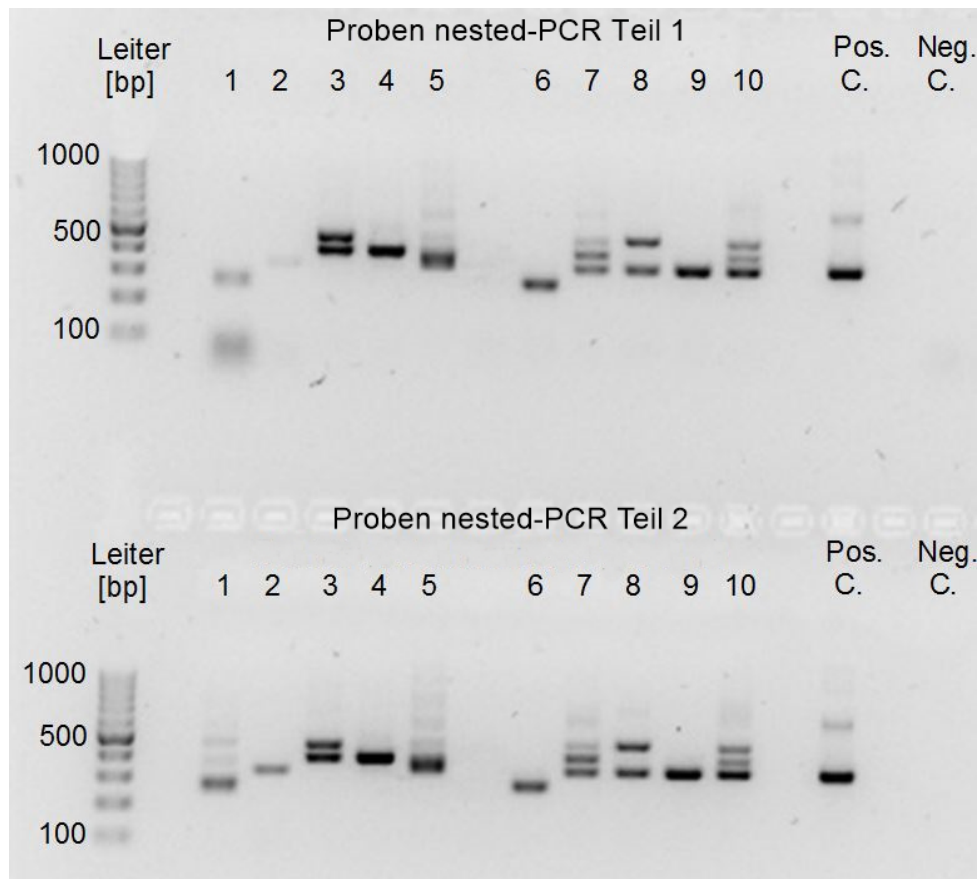


Abbildung 3.2: Ergebnisse der PCR nach optimierter Extraktion sowie PCR für Pilz-DNA aus Stuhlproben. Links im Bild ist eine 1000bp DNA-Leiter aufgetragen. Anschließend sind Proben verschiedener Extraktionsmethoden für einen Vergleich miteinander aufgetragen. Probe 1 stammt aus Versuch 4.2, die pilzliche DNA aus Mäusekot, welcher direkt aus dem Kolon entnommen wurde, enthält. Die Extraktion erfolgte mit Hilfe von β -Mercaptoethanol und Glucanex (75mg/dl). Probe 2 stammt aus Versuch 6, dessen Extraktion mit 12,5 μ l β -Mercaptoethanol, Lyticase und Glucanex (75mg/dl) aus humanem Stuhl durchgeführt wurde. Probe 3 und 4 stammen aus Versuch 7. Hier wurde die DNA mit Hilfe 100% Methanol und 0,9% NaCl aus humanem Stuhl extrahiert. Probe 5 stammt aus Versuch 5, in dem die Extraktion mit 5 μ l β -Mercaptoethanol, Lyticase und Glucanex (75mg/dl) aus humanem Stuhl durchgeführt wurde. Nach einem freien Well folgen die so eben genannten Proben in gleicher Reihenfolge, jedoch 1:2 mit PCR-H₂O verdünnt. Die Verdünnung erfolgte mit der Fragestellung, ob sich so das Ergebnis der PCR verbessern ließe. Anschließend ist die Positivkontrolle „pos.C.“ aufgetragen. Diese enthält DNA von *Candida tropicalis*. Zuletzt folgt die Negativkontrolle „neg.C.“. Hier wurde PCR-H₂O verwendet. Es sind die Proben nach beiden durchgeführten Teilen der nested-PCR aufgetragen.

3.2 Entwicklung der PCR für die ITS1-Region

Das von Iliev et al. (2012) zur Verfügung gestellte und zuerst genutzte PCR-Protokoll brachte nur ein spezifisches Produkt der Positivkontrolle zur Darstellung. Deswegen schlossen sich einige Modifikationen an. Der erste Versuch hierzu beinhaltete eine Variation der Template-DNA-Menge von den im Protokoll geforderten 1 μ l auf 2 μ l, 4 μ l, 1 μ l 1:2 verdünnter Template DNA und 1 μ l 1:10 verdünnter Template DNA. Zusätzlich wurden die Versuchsansätze mit der einfachen Menge an Primern, der doppelten Menge an Primern sowie der einfachen Menge der Primer mit Barcode angesetzt. Des Weiteren wurde eine zusätzliche Versuchsreihe angesetzt, in der die Mg²⁺-Konzentrationen zwischen 1,25mM, 2,5mM, 4mM und 6mM variierten. Insgesamt führte

Tabelle 3.3: PCR-Protokoll für ITS1 nach 16S V1V2 library preparation protocol for MiSeq und das dazugehörige Maschinen-Protokoll

Substanz	Volumina in μl
PCR-grade- H_2O	4,6
5x buffer	2,5
dNTP mix 10mM	0,25
Taq-Polymerase	0,15
Primer ITS1f	2,0
Primer ITS2	2,0
Template DNA	1

Maschinen-Protokoll (40 Zyklen)

- | | | | |
|----|----|----------|---------------|
| 1. | 95 | 3min | |
| 2. | 98 | 20s | } $\times 40$ |
| 3. | 55 | 30s | |
| 4. | 72 | 2min | |
| 5. | 72 | 10min | |
| 6. | 4 | ∞ | |

jedoch keine dieser Veränderungen zu einem spezifischen ITS1-Produkt nach PCR, abgesehen von der Positivkontrolle. Deshalb wurde nachfolgend das Protokoll verwendet, das normalerweise für die Amplifikation der bakteriellen DNA verwendet wird (Tabelle 3.3).

Die Nutzung des PCR-Protokolls für ITS1 nach 16S V1V2 library preparation protocol for MiSeq mit den Proben, die mit erhöhten Konzentrationen an β -Mercaptoethanol extrahiert worden waren sowie mit den Proben, die mit Methanol und 0,9%iger NaCl-Lösung extrahiert worden waren, zeigte eine deutliche Verbesserung der Methodik. Es zeigten sich nicht nur spezifische Produkte bei der Positivkontrolle, sondern auch bei den bearbeiteten Stuhlproben. Dennoch fanden sich viele Primer Dimer-Produkte und die nachfolgende Verwendung von Illumina-Primern inklusive Barcodes und MiSeq-spezifischen Adaptoren in der PCR lieferten keine spezifischen Produkte. Aus diesem Grund folgten verschiedene Veränderungen der PCR-Reagenzien: Erstens die Verwendung steigender Magnesiumkonzentrationen (1,5 mM, 1,75 mM, 2 mM, 2,25 mM, 2,5 mM, 4 mM, und 6 mM) sowie zweitens die Verwendung geringerer Primer-Volumina (1 μl und 0,5 μl). Mit beiden Anpassungen konnte jedoch keine Optimierung der PCR-Produkte erreicht werden. Ein weiterer Versuch nutzte das im Beiblatt der Taq-Polymerase von BioLabs enthaltende PCR-Protokoll, bei der unter anderem auch Dimethylsulfoxid (DMSO) in den Ansatz gegeben wird. DMSO kann die Spezifität steigern und die Amplifikation von GC-reichen Sequenzen erleichtern (Mülhardt, 2013). Trotz einer zusätzlichen Variation der Mg^{2+} -Konzentration lieferte auch dieses Protokoll keine spezifischen Produkte. Aufgrund der generell schwierigen Methodik wurden einige Proben an zwei unterschiedliche Firmen versendet, um die generelle Umsetzbarkeit des Projekts zu überprüfen. Trotz ihrer Expertise in diesem Bereich gelang es jedoch nur einer Firma (LGC Genomics GmbH), die Pilzprofile der jeweiligen Proben über eine Amplifikation sowohl der ITS1- als auch der ITS2-Regionen zu gewinnen. Für die Etablierung in unserem Labor wurde nun eine nested-PCR getestet. Eine nested-PCR besteht aus drei Schritten: Zunächst wird eine PCR zur Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes durchgeführt, woraufhin die amplifizierten

Produkte aufgereinigt und anschließend in einer zweiten PCR, deren Zielregion innerhalb des zunächst amplifizierten Abschnittes liegt, genutzt werden. Die Namensgebung der nested-PCR, also einer „verschachtelten“ PCR, kommt folglich von den durch die Primerpaare eingeschlossenen ineinanderliegenden DNA-Abschnitten. Das Protokoll ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Nested-PCR-Protokoll für ITS1 mit dem dazugehörigen Maschinen-Protokoll

Substanz	Volumina in μl
PCR-grade- H_2O	13
5x buffer	5
dNTP mix 10mM	0,5
Taq-Polymerase	0,5
Primer	1
Primer	1
Template DNA	4

Maschinen-Protokoll (30 Zyklen)

1.	98	30s	
2.	98	9s	} $\times 30$
3.	50	1min	
4.	72	90s	
5.	72	10min	
6.	4	∞	

In dieser nested-PCR wurde die zuerst durchgeführte PCR mit den Primern ITS1F und ITS4 durchgeführt. Die Anlagerungspunkte der Primer an der DNA sind in Abb. 3.3 dargestellt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers. Die zweite PCR nutzte hieraufhin die Primer ITS1F und ITS2R, deren Zielregion innerhalb der zuerst hergestellten Matrizen liegt, wie an Abb. 3.3 ersichtlich.



Abbildung 3.3: Struktur der nukleären rRNA-Gene und ihrer ITS-Regionen sowie der genutzten Primer im Rahmen einer nested-PCR. Die Skalierung erfolgt auf die Größenverhältnisse für die bei *Saccharomyces cerevisiae* beschriebenen Größen in der GenBank. Ausnahme bildet die 5.8S-Region, die mit vierfacher Vergrößerung abgebildet ist um die Anschaulichkeit zu verbessern. Die Primer ITS1f und ITS4 werden im ersten Teil der nested-PCR genutzt. Der amplifizierte DNA-Abschnitt beinhaltet den DNA-Abschnitt, der von den Primern ITS1f und ITS2R in der nach Aufreinigung folgenden zweiten PCR eingeschlossen wird. Die Lokalisation der in diesem Teil genutzten Primer ist schematisch wiedergegeben.

Die Anwendung der nested-PCR führte zu spezifischen Produkten in den untersuchten Stuhlproben (Abb. 3.4). Da sich jedoch in der Negativkontrolle Primer Dimere gebildet hatten, wurde nachfolgend die Zyklenanzahl der zweiten PCR variiert von 30 Zyklen auf einmal 20 Zyklen und in einem weiteren Versuch auf 25 Zyklen. Die Anwendung des Protokolls mit der Verwendung

von 30 Zyklen in der ersten und 20 Zyklen in der zweiten PCR führte schließlich zu einer erfolgreichen Amplifikation der ITS1-Region in humanen Stuhlproben.

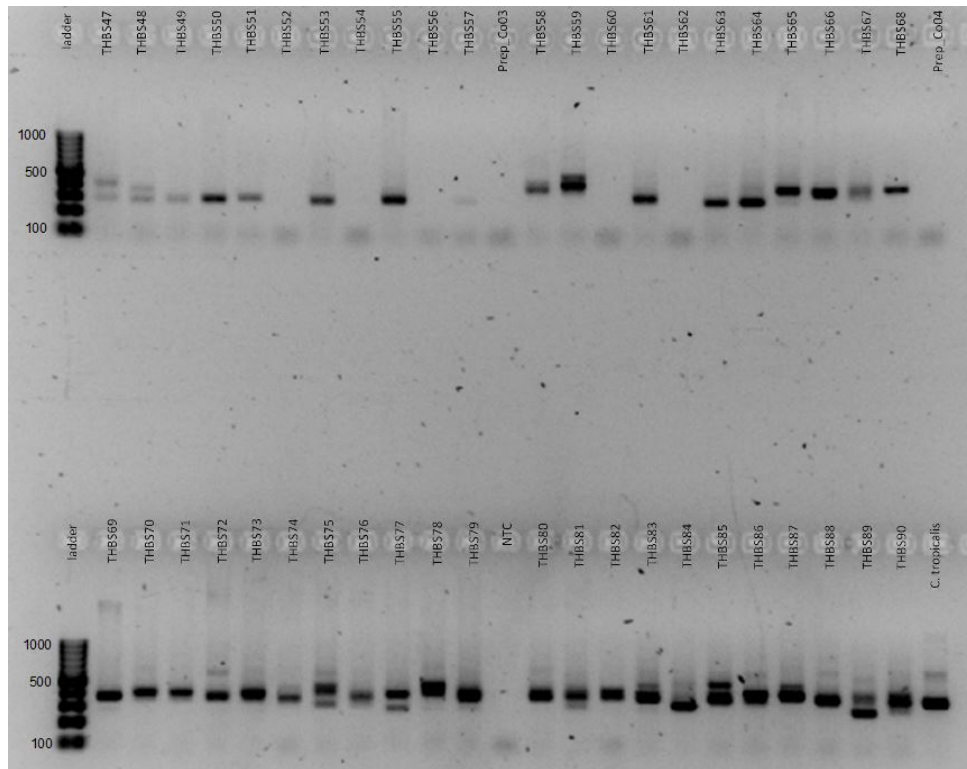


Abbildung 3.4: Ergebnisse des etablierten nested-PCR Protokolls für die Amplifikation von Pilz-DNA aus humanen Stuhlproben. Beide Reihen verfügen über einen Komigrationsstandard in Form einer 1000bp DNA-Leiter. Sie wurde jeweils links in den Reihen aufgetragen und wird als „ladder“ bezeichnet. Anschließend folgen Proben der BSP/SPC-Kohorte, die fortlaufend von THBS47 bis THBS90 durchnummeriert sind. Zusätzlich finden sich in der ersten Reihe zwei Leerproben, bezeichnet als „Prep_Co03“ und „Prep_Co04“. Diese Leerproben sind Extraktionskontrollen, welche ohne Stuhl durchgeführt wurden und der Überprüfung von Geräten und Reagenzien gelten. In der unteren Reihe ist etwa mittig die Negativkontrolle „NTC“ (no template control) in Form von PCR-H₂O aufgetragen. Die Positivkontrolle „C. tropicalis“ befindet sich in der unteren Reihe rechts. Sie enthält DNA von *Candida tropicalis*. Aufgetragen sind insgesamt alle Proben nach Durchführung der gesamten nested-PCR.

Zudem konnte unter Verwendung der ITS1F- und ITS2-Primer ohne die Anwendung der nested-PCR die ITS1-Region in humanen Stuhlproben erfolgreich amplifiziert werden.

3.3 Entwicklung der PCR für die ITS2-Region

Da auch das von Ihrmark et al. (2012) zur Verfügung gestellte Protokoll für die Amplifizierung der ITS2-Region wiederum lediglich für die Positivkontrolle erfolgreich war, wurde es schrittweise angepasst und führte wie in Tabelle 3.5 zusammengefasst zu einer Amplifizierung der ITS2-Region auch in den getesteten Stuhlproben.

Tabelle 3.5: Etabliertes Maschinen-Protokoll für die Amplifizierung der ITS2-Region in Stuhlproben (40 Zyklen)

1.	98	30s	} × 30
2.	98	9s	
3.	57	1min	
4.	72	90s	
5.	72	10min	
6.	4	∞	

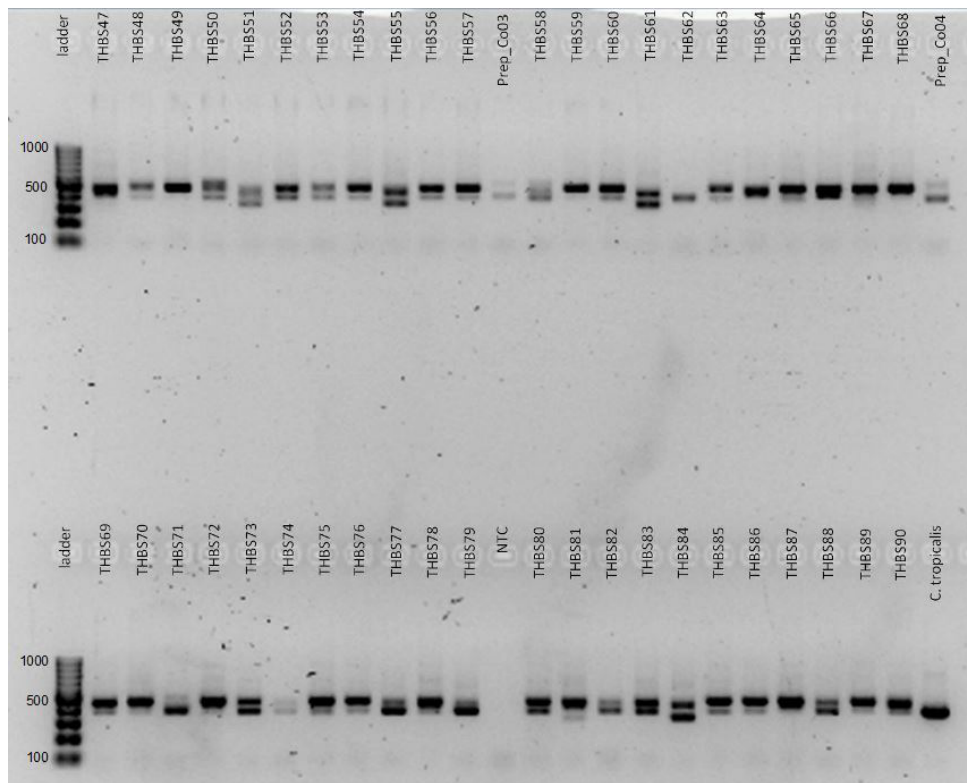


Abbildung 3.5: Ergebnisse der Amplifikation für die ITS2-Region aus Pilz-DNA in Stuhlproben. Links in den beiden Reihen ist eine 1000bp DNA-Leiter aufgetragen, bezeichnet als „ladder“. Sie enthält DNA-Stränge bekannter Längen und dient als Komigrationsstandard. Anschließend folgen Proben der BSP/SPC-Kohorte, die von THBS47 bis THBS90 durchnummeriert sind. Zusätzlich wurden zwei Leerproben in der oberen Reihe aufgetragen. Diese dienen der Kontrolle der Reagenzien und Geräte im Rahmen der Extraktion, indem diese ohne Zugabe von Stuhl durchgeführt wird. Diese Leerproben sind als „Prep-Co03“ und „Prep-Co04“ bezeichnet. Die Negativkontrolle „NTC“ (no template control) befindet sich mittig in der unteren Reihe. Hier wurde PCR H₂O verwendet. In der unteren Reihe rechts wurde die Positivkontrolle „C. tropicalis“ aufgetragen. Diese enthält DNA von *Candida tropicalis*.

3.4 Vergleich der etablierten PCR-Protokolle

Schlussendlich konnten drei verschiedene PCR-Protokolle etabliert werden, die in der Lage waren pilzspezifische Produkte zu amplifizieren. Dies waren zwei Protokolle für die ITS1-Region: Ein Ansatz bestand in der nested-PCR mit den Primern ITS1F und ITS4 im ersten Lauf und den Primern ITS1F und ITS2R nach der Aufreinigung im zweiten Lauf. Der andere Ansatz für die ITS1-Region nutzte dasselbe Protokoll ohne den Verschachtelungsansatz mit den Primern ITS1F

und ITS2R. Des Weiteren konnte ein Protokoll für die ITS2-Region mit den Primern ITS4 und ITS7F etabliert werden.

3.4.1 Vergleich der nested-PCR, der einfachen PCR für die ITS1-Region sowie der PCR für die ITS2-Region

Die etablierten Protokolle wurden zunächst miteinander verglichen. Hierfür wurden fünf Proben der BSP/SPC-Kohorte, zwei Proben der FoCUS-Kohorte und eine Probe der Kindred-Kohorte genutzt. Diese Proben wurden bezüglich der ITS1-Region mit der nested-PCR sowie der einfachen PCR und bezüglich der ITS2-Region mit der hierfür etablierten PCR untersucht. Bei der ITS2-Region erfolgte eine zusätzliche Analyse drei der BSP/SPC-Proben sowie der Probe aus der Kindred-Kohorte. Anschließend sollte nachgewiesen werden, ob die jeweilige Methode in der Lage war, ein Taxon zu erfassen. Hierfür wurde die Präsenz (P) bzw. Absenz (A) der Taxa geprüft und paarweise mit dem Fisher-Test verglichen. Der Fisher-Test ist eine Alternative zum Chi-Quadrat Unabhängigkeitstest bei Kontingenztafeln und benötigt nicht die Voraussetzung einer gewissen erwarteten Häufigkeit pro Zelle. Er wird vor allem für kleinere Proben verwendet. Im vorliegenden Versuchsansatz wurde die Nullhypothese „Es besteht kein Unterschied darin ein Taxon nachzuweisen zwischen der ITS1- und der ITS2-Region“ geprüft. Ist der errechnete p-Wert größer als 0,05, muss die Nullhypothese beibehalten werden. Ist der p-Wert kleiner oder gleich 0,05, wird die Nullhypothese verworfen und es besteht ein signifikanter Unterschied in der Fähigkeit das jeweilige Taxon nachzuweisen.

Tabelle 3.6: Vergleich der Detektionsfähigkeit verschiedener Taxa durch Erfassung über die einfache PCR für die ITS1-Region, bzw. der PCR für die ITS2-Region. Dargestellt ist die Fähigkeit der einfachen PCR zur Untersuchung der ITS1-Region, bzw. der PCR zur Untersuchung der ITS2-Region, ein Taxon auf Gattungsebene zu erfassen (P für Präsenz) oder nicht zu erfassen (A für Absenz). Der Vergleich erfolgt durch Berechnung des p-Wertes über den Fisher-Test. C steht für Klasse (class), f für Familie, g für Gattung und o für Ordnung. Grün hinterlegte Felder zeigen eine signifikant bessere Detektion über die ITS2-Sequenzen und orange hinterlegte Felder zeigen eine signifikant bessere Detektion über die ITS1-Sequenzen.

	P in ITS1	A in ITS1	P in ITS2	A in ITS2	p(Fisher)
c.Dothideomycetes	1	7	9	3	0,019
c.Saccharomycetes	0	8	12	0	0,0000079
f.Chaetomiaceae	0	8	6	6	0,042
f.Dipodascaceae	5	3	0	12	0,036
g.Saccharomyces	6	2	2	10	0,019
o.Onygenales	3	5	0	12	0,049

Die Untersuchung konnte für die ITS1-Region mit der einfachen PCR in einer von acht Proben die Klasse Dothideomycetes nachweisen, in keiner der Proben die Klasse Saccharomycetes oder die Familie Chaetomiaceae, in fünf von acht Proben die Familie Dipodascaceae, in sechs von acht Proben die Gattung *Saccharomyces* und in drei von acht Proben die Ordnung Onygenales (Tabelle 3.6). Für die ITS2-Region konnte die Untersuchung in neun von zwölf Proben die Klasse Dothideomycetes nachweisen, in allen zwölf Proben die Klasse Saccharomycetes, in sechs von zwölf Proben die Familie Chaetomiaceae, in zwei von zwölf Proben die Gattung *Saccharomyces* und in keiner der Proben die Familie Dipodascaceae oder die Ordnung Onygenales. Die Taxono-

mie der nachgewiesenen Pilze ist in Abb. 3.6 ersichtlich. Hierbei wird auch deutlich, dass sowohl über die Sequenzierung der ITS1- als auch der ITS2-Sequenzen lediglich Pilze der Abteilung der Ascomycota gefunden wurden. Über den Fisher-Test war zu erkennen, dass die Unterschiede im Nachweis der einzelnen Taxa mit einer der beiden PCR-Methoden stets signifikant waren. So konnte die ITS2-Region signifikant besser die Klasse Dothideomycetes und die Klasse Saccharomycetes sowie die Familie der Chaetomiaceae nachweisen. Die ITS1-Region konnte signifikant besser die Familie der Dipodascaceae, die Gattung *Saccharomyces* und die Ordnung Onygenales nachweisen.

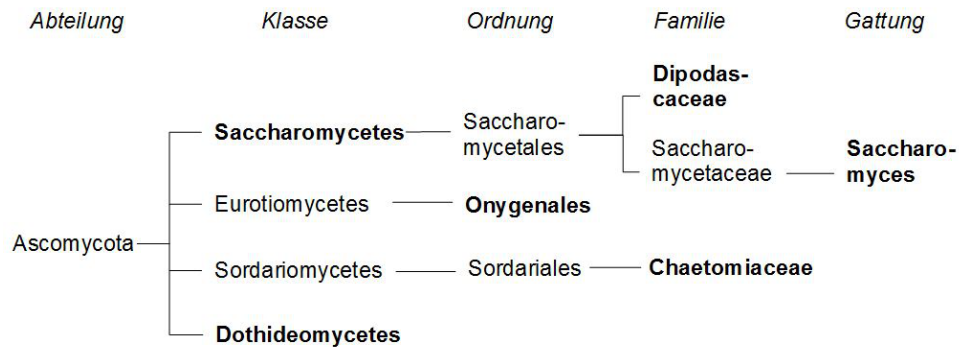


Abbildung 3.6: Systematik der detektierten Pilze. Dargestellt sind die verwandtschaftlichen Beziehungen und die näheren taxonomischen Aufgliederungen der nachgewiesenen Pilze. Nachgewiesene Pilze sind fett dargestellt.

Anschließend folgte der Vergleich zwischen der über die nested-PCR gewonnenen ITS1-Sequenzen mit den für die ITS2-Region gewonnenen Sequenzen (Tabelle 3.7). Diese Untersuchung konnte für die ITS1-Region in einer von acht Proben die Klasse Dothideomycetes nachweisen, in einer von acht Proben die Klasse Saccharomycetes, in keiner von acht Proben die Familie Chaetomiaceae und in vier von acht Proben die Familie Dipodascaceae. Für die ITS2-Region konnte diese Untersuchung in neun von zwölf Proben die Klasse Dothideomycetes nachweisen, in allen zwölf Proben die Klasse Saccharomycetes, in sechs von zwölf Proben die Familie Chaetomiaceae und in keiner von zwölf Proben die Familie Dipodascaceae. Bei jedem untersuchten Taxon erzielte eine PCR einen signifikant besseren Nachweis als die andere PCR. So konnte die ITS2-Region abermals signifikant besser die Klasse Dothideomycetes und die Klasse Saccharomycetes sowie die Familie der Chaetomiaceae nachweisen. Die ITS1-Region erbrachte einen signifikant besseren Nachweis der Familie der Dipodascaceae.

Der Vergleich der über die einfache oder die nested-PCR gewonnenen ITS1-Sequenzen lieferte keine signifikanten Unterschiede im Fisher-Test. Schlussendlich lässt sich aus dieser Untersuchung ableiten, dass die ITS1-Region zwar die Klasse der Saccharomycetes nicht gut erkennt, dafür jedoch die feinere Taxonomie in Form der Gattung der *Saccharomyces* und als feine Taxonomie die Familie Dipodascaceae, die die ITS2-Region nicht detektiert. Die ITS2-Region erkennt besser die Klassen der Dothideomycetes und Saccharomycetes und sie detektiert Chaetomiaceae, die die ITS1-Region nicht erkennt. Eine weitere Beobachtung dieses Testlaufs war, dass die PCR für die ITS2-Region auch pflanzliche ITS2-Sequenzen amplifiziert, während dieser Anteil bei den anderen beiden PCR-Ansätzen für die ITS1-Region deutlich geringer ist. Des Weiteren ist die

Tabelle 3.7: Darstellung der Fähigkeit verschiedene Taxa über die nested-PCR für die ITS1-Region, bzw. über die PCR für die ITS2-Region zu detektieren. Durch Berechnung des p-Wertes über den Fisher-Test soll ein Vergleich der Detektionsmöglichkeiten verschiedener Taxa mithilfe der genannten beiden PCR durchgeführt werden. Grün hinterlegt sind Felder mit einer signifikant besseren Detektion über die ITS2-Sequenzen. Orange hinterlegt sind Felder mit einer signifikant bessere Detektion über die ITS1-Sequenzen. P steht für das Erfassen der Präsenz (P) eines Taxons, A für die Unfähigkeit ein Taxon zu erfassen (A für Absenz). Weiterhin steht c für Klasse (class), f für Familie, g für Gattung und o für Ordnung.

	P in nested	A in nested	P in ITS2	A in ITS2	p(Fisher)
c.Dothiedomycetes	1	7	9	3	0,019
c.Saccharomycetes	1	7	12	0	0,0001
f.Chaetomiaceae	0	8	6	6	0,041
f.Dipodascaceae	4	4	0	12	0,014

Abteilung der Ascomycota unabhängig von der amplifizierten Region die am meisten vertretene Gruppe, während die Abteilung der Basidiomycota vor allem in den ITS2-Sequenzen vertreten ist. Andere Abteilungen sind vernachlässigbar.

Aufgrund der nicht signifikanten Unterschiede zwischen den erhaltenen Sequenzen der nested-PCR und der einfachen PCR für die ITS1-Region, wurde der Ansatz der nested-PCR hiernach verworfen.

3.4.2 Vergleich der PCR für die ITS1- sowie die ITS2-Region

Die nachfolgende Datenanalyse sollte zeigen, ob die über die jeweilige PCR gewonnene Anzahl an gelieferten Daten qualitativ ausreichend gute Sequenzen nach der Datenprozessierung hervorbringt. In diese Analyse wurden 192 Proben einbezogen, die mit den ITS1F- und ITS2R-Primern für die ITS1-Region und den ITS7F- und ITS4-Primern für die ITS2-Region untersucht wurden.

Tabelle 3.8: Anzahl und Anteil der Proben, die eine bestimmte Anzahl qualitativ ausreichender Sequenzen der ITS1-, bzw. ITS2-Region liefern. Darstellung der Anzahl der Proben, die nach der Datenverarbeitung der Rohdaten qualitativ ausreichende Sequenzen (clean reads) in den Größenordnungen zwischen >10000 und >1000 clean reads lieferten. Die erste Zeile nennt die Anzahl der gelieferten clean reads je Probe. Die orange hinterlegten Zeilen zwei und drei nennen die Anzahl der Proben, die über die ITS1-Amplifikation die jeweilige Anzahl an clean reads geliefert haben, bzw. deren Anteil an allen 192 Proben. Die grün hinterlegten Zeilen vier und fünf nennen die Anzahl der Proben, die über die ITS2-Amplifikation die jeweilige Anzahl an clean reads geliefert haben, bzw. deren Anteil an allen 192 untersuchten Proben.

Clean Reads	>10000	>5000	>2500	>1000
ITS1	2	8	22	58
Anteil	0,010	0,042	0,115	0,302
ITS2	139	158	165	172
Anteil	0,724	0,823	0,859	0,896

Aus diesem Vergleich wurde ersichtlich, dass über die ITS2-Amplifikation wesentlich mehr qualitativ ausreichende Sequenzen gewonnen wurden. So lieferten für die ITS2-Region 158 Proben, bzw. 82,3% aller Proben mehr als 5000 Sequenzen. Für die ITS1-Region hingegen lieferten nur acht Proben, bzw. 4,2% aller Proben mehr als 5000 Sequenzen. Für die schlussendliche Analyse des Mykobioms wurde ein Grenzwert von 5000 Sequenzen je Probe zugrunde gelegt.

Aufgrund der schlechten Performance der ITS1-Sequenzierung wurde die nachfolgende Analyse des Mykobioms ausschließlich über die ITS2-Region durchgeführt.

3.4.3 Analyse des Mykobioms

Innerhalb dieser Arbeit wurden insgesamt 536 Proben hinsichtlich des Mykobioms analysiert. Ein Lauf mit 190 Proben musste verworfen werden. Von den verbliebenen 346 Proben konnten nach der Datenprozessierung noch 258 Proben in die Auswertung der Sequenzierung einbezogen werden. 60 Proben stammten hierunter von gesunden Individuen, 92 Proben stammten von Individuen mit Morbus Crohn, 60 Proben von Individuen mit Colitis ulcerosa, 22 Proben von Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis ohne Colitis ulcerosa und 24 Proben von Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis mit Colitis ulcerosa. Zum besseren Verständnis der Beziehungen der nachgewiesenen Pilztaxa enthält Abb. 3.7 eine Darstellung der Systematik.

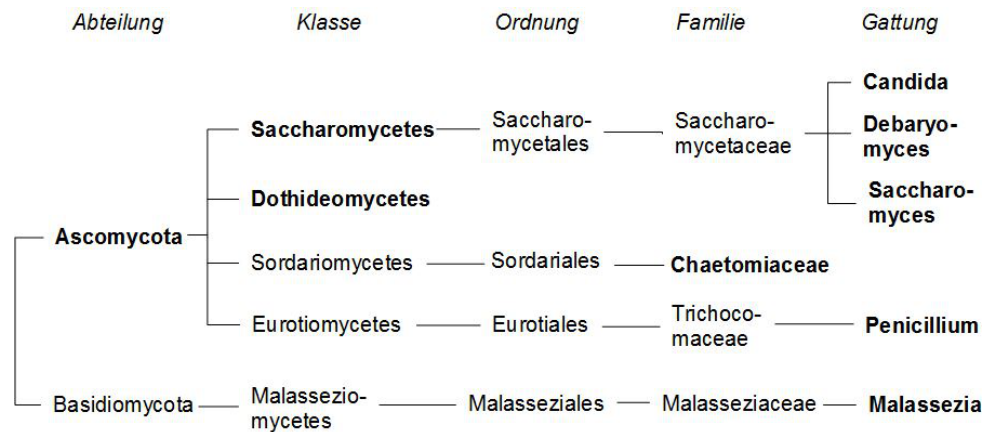


Abbildung 3.7: Darstellung der Taxonomie der über die ITS2-Region nachgewiesenen Pilztaxa. Fett hervorgehoben sind die detektierten Pilze.

3.4.3.1 Nachgewiesene Pilztaxa in den Kohorten

In Tabelle 3.9 ist dargestellt, welche Pilztaxa in welcher Kohorte nachgewiesen wurden und bei wie vielen Probanden dies der Fall war.

Es ist ersichtlich, dass die Klasse der Saccharomycetes bei jedem einzelnen Probanden über alle Kohorten hinweg gefunden wurde. Die Klasse der Dothideomycetes wurde über alle Kohorten hinweg bei etwa einem Viertel der Probanden gefunden. Lediglich die Kohorte der Patienten mit Colitis ulcerosa bildete hier eine Ausnahme, da Dothideomycetes hier nur in 15% der untersuchten Probanden gefunden werden konnten. Betrachtet man die Familie der Chaetomiaceae, fiel auf, dass diese bei einem eher kleinen Prozentsatz der Probanden der Kohorten gefunden wurde. Ausnahme bildete hier die Kohorte der Patienten mit PSC, in der sie in über 80% der Probanden nachgewiesen wurde. Bei der Gattung *Malassezia* fällt auf, dass diese bei weniger Probanden der Kohorten mit Morbus Crohn (19,6%) und vor allem Colitis ulcerosa (11,7%) im Vergleich mit Gesunden (30%) gefunden wurde. Patienten mit PSC wiesen hier den höchsten Anteil (50%, bzw. 41,7%) an Probanden mit einem *Malassezia*-Nachweis auf. Die Gattung *Pe-*

Tabelle 3.9: Kohorten und darin nachgewiesene Pilztaxa. Darstellung der einzelnen Kohorten mit Angabe der Prozentzahl an Probanden, bei der das jeweilige Pilztaxon gefunden wurde. Dargestellte Kohorten: Gesunde, MC = Individuen mit Morbus Crohn, CU = Individuen mit Colitis ulcerosa, PSC-CU = Individuen mit primär sklerosierender Cholangitis ohne gleichzeitiger Erkrankung an Colitis ulcerosa, PSC+CU = Individuen mit primär sklerosierender Cholangitis mit gleichzeitiger Erkrankung an Colitis ulcerosa. Dargestellte Pilztaxa mit c für Klasse (class), f für Familie, g für Gattung und p für Abteilung (phylum).

Pilztaxa	Gesunde[%]	MC[%]	CU[%]	PSC-CU[%]	PSC+CU[%]
c:Dothideomycetes	25	25	15	22,7	25
c:Saccharomycetes	100	100	100	100	100
f:Chaetomiaceae	33,3	19,6	18,3	81,8	83,3
g:Candida	83,3	71,7	60	72,7	83,3
g:Debaryomyces	58,3	23,9	31,7	45,5	33,3
g:Malassezia	30	19,6	11,7	50	41,7
g:Penicillium	28,3	25	23,3	27,3	20,8
g:Saccharomyces	65	57,6	61,7	40,9	62,5
p:Ascomycota	65	42,4	38,3	95,5	91,7

nicillium wiederum wurde über alle Kohorten hinweg zu ungefähr gleichen Teilen gefunden. Dies traf auch auf die Gattung *Saccharomyces* zu (57,6%-65%), jedoch bildete hier die Kohorte der Patienten mit PSC ohne gleichzeitiges Vorliegen einer Colitis ulcerosa eine Ausnahme mit einem geringeren anteiligem Nachweis (40,9%). Die Systematik der nachgewiesenen Pilztaxa ist in Abb. 3.7 wiedergegeben.

3.4.3.2 Abundanzen der nachgewiesenen Pilztaxa

Interessant ist jedoch nicht nur der Anteil einer Kohorte, bei dem der jeweilige Pilz nachgewiesen wurde, sondern auch die unterschiedliche Anzahl der nachgewiesenen Sequenzen innerhalb einer Kohorte und zwischen den einzelnen Kohorten. Das oftmals starke Abweichen von Mittelwert und Median der Anzahl der nachgewiesenen Sequenzen zeigt, dass es in einer Gruppe zu starken Abweichungen der Anzahl der Sequenzen zwischen den Proben kommen kann. In Abb. 3.6 sind die Plots der logarithmisch aufgetragenen Sequenzen je Pilztaxon in den einzelnen Kohorten dargestellt.

Mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentestes wurde analysiert, ob es signifikante Unterschiede zwischen zwei Kohorten, z.B. gesunden Patienten und Patienten mit Morbus Crohn, bezüglich der nachgewiesenen Pilztaxa gibt. Dieser Test wurde gewählt, da er robust bei kleinen, unterschiedlich großen, nicht normal verteilten Stichproben ist. Die Nullhypothese geht davon aus, dass beide Stichproben bezüglich des Auftretens des gewählten Pilzes gleich sind. Ist der p-Wert $< 0,05$, wird die Nullhypothese verworfen. Dies heißt, die verglichenen Gruppen unterscheiden sich signifikant im Auftreten des gewählten Pilzes.

Es wurde somit deutlich, dass sich Gesunde und PSC-Patienten signifikant unterscheiden im Vorkommen der Familie der Chaetomiaceae (p-Wert = $1,88 \times 10^{-10}$), der Gattung *Malassezia* (p-Wert = 0,026) sowie der Abteilung der Ascomycota (p-Wert = $9,56 \times 10^{-08}$). Gesunde und Patienten mit Colitis ulcerosa unterscheiden sich signifikant im Vorkommen der Gattung *Candida* (p-Wert = 0,004), der Gattung *Debaryomyces* (p-Wert = 0,003), der Gattung *Malassezia*

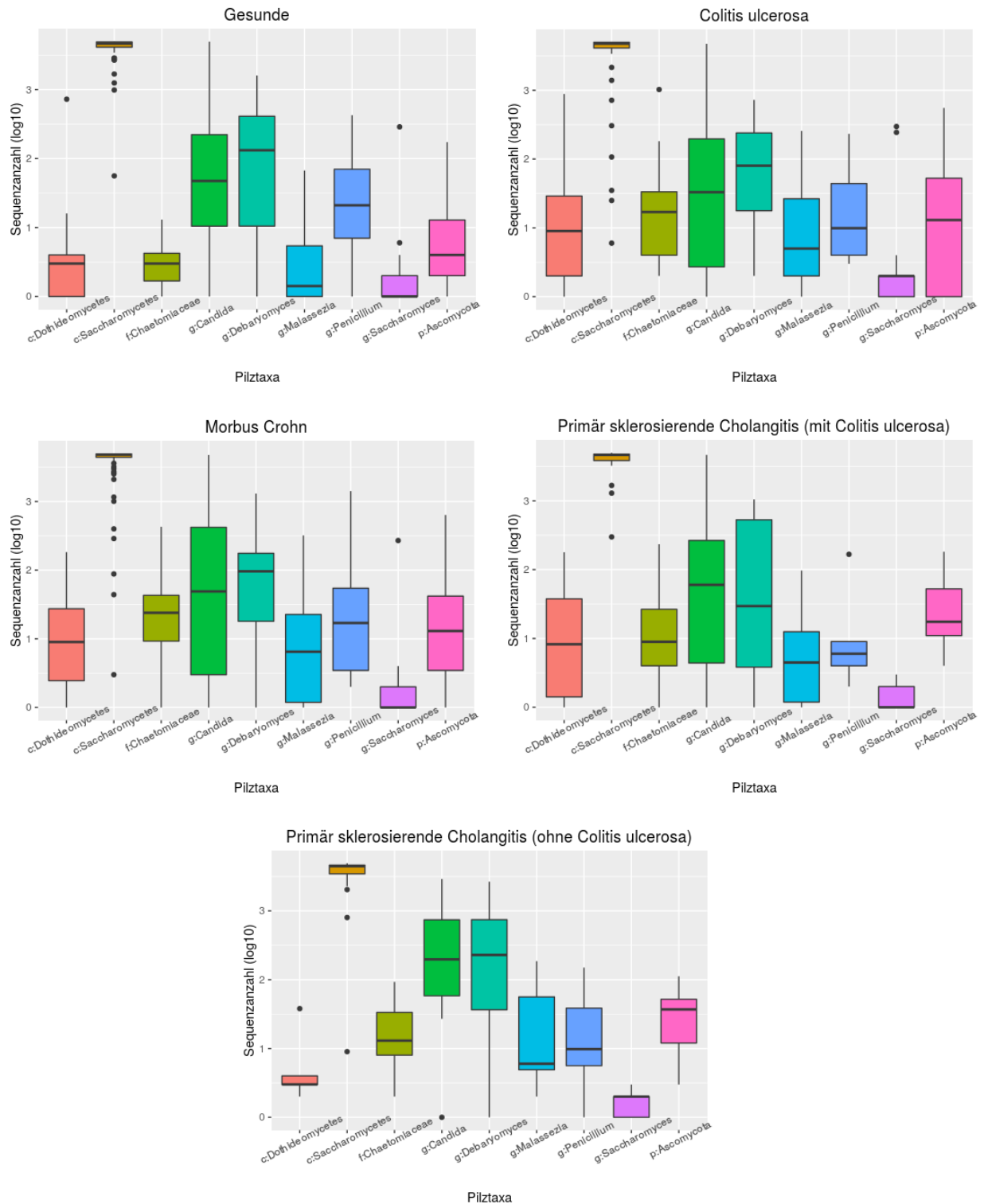
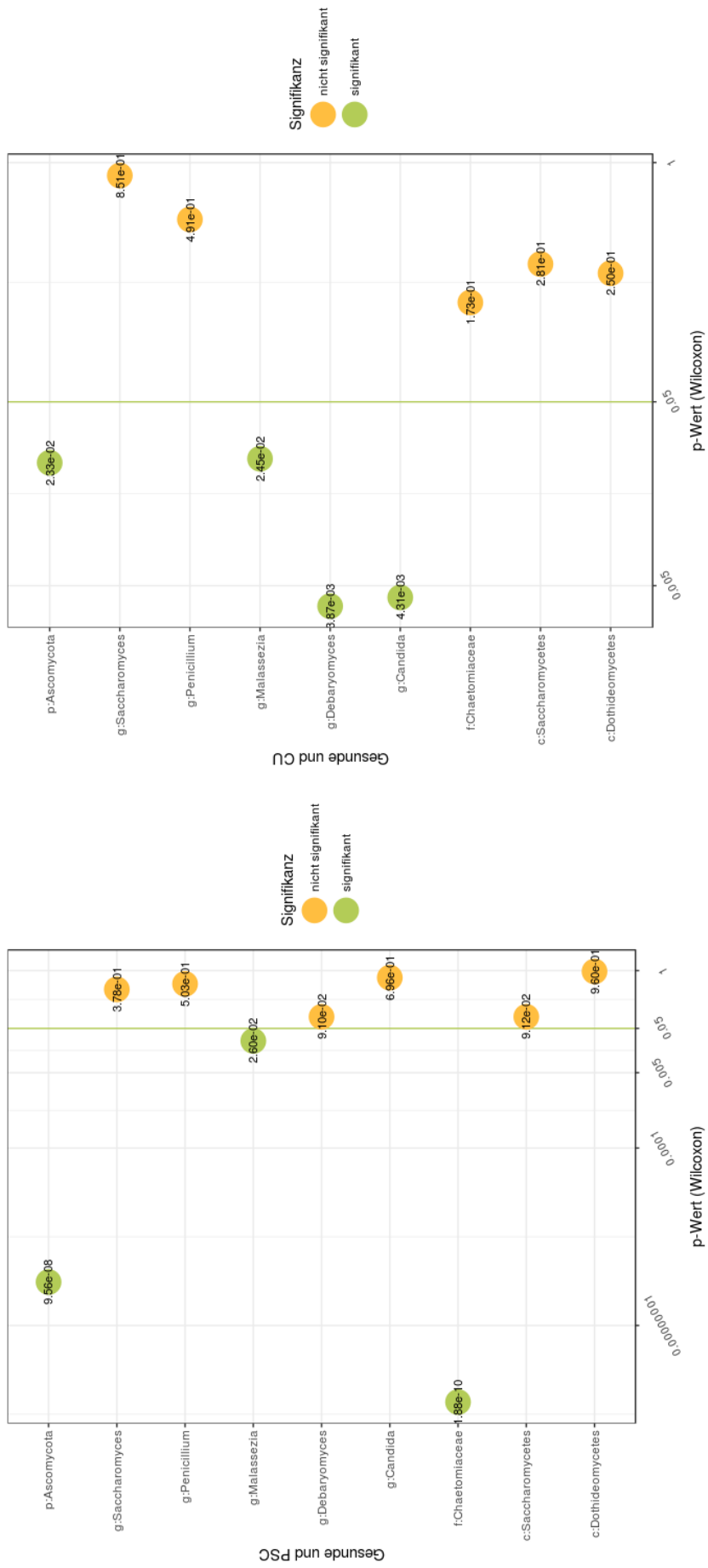
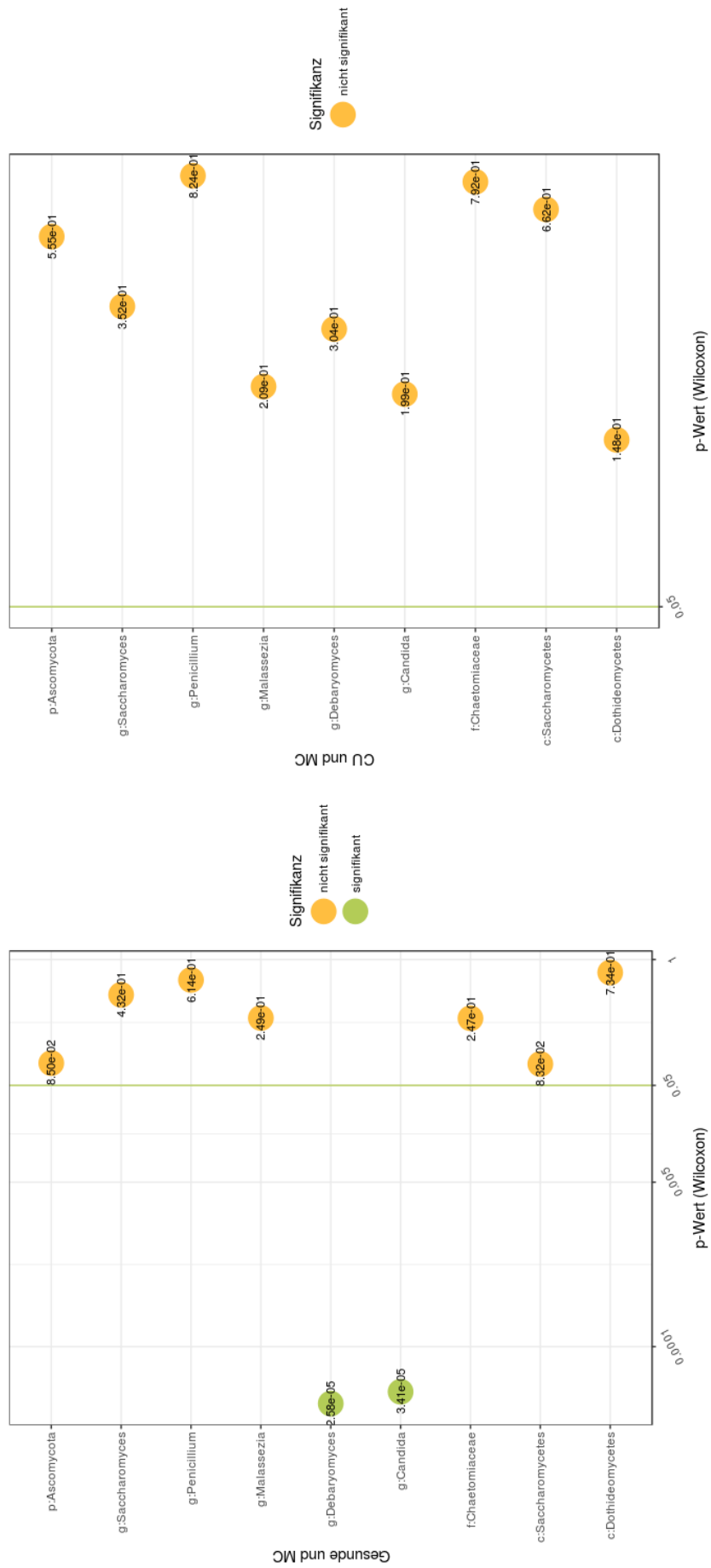
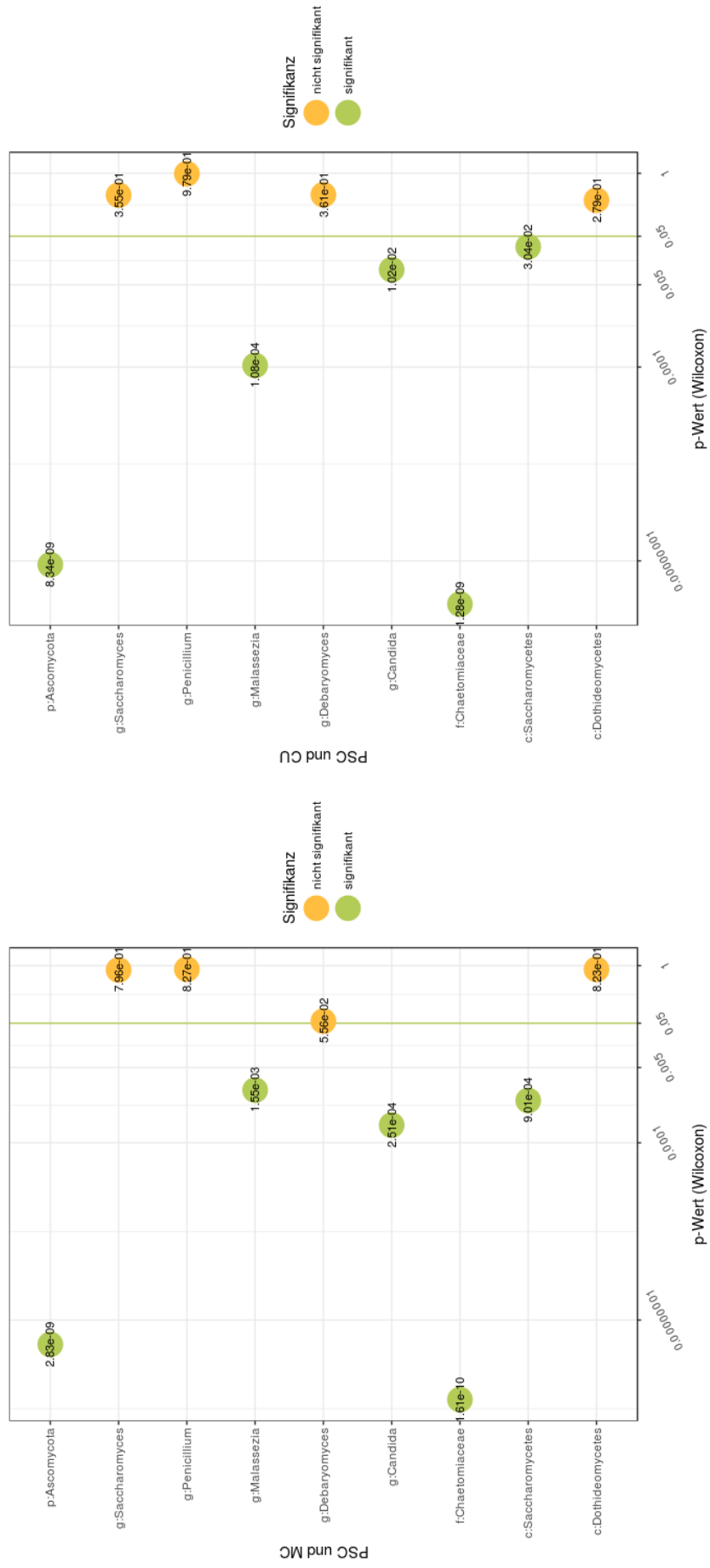


Abbildung 3.8: Darstellung der gefundenen Pilzsequenzen der Pilztaxa in den verschiedenen Kohorten. Auf der Ordinate sind die Sequenzanzahlen logarithmisch aufgetragen. Auf der Abszisse sind die einzelnen Pilztaxa aufgeführt mit c für Klasse (class), f für Familie, g für Gattung und p für Abteilung (phylum). Über der jeweiligen Abbildung ist die zugehörige Kohorte aufgeführt.

(p-Wert = 0,024) sowie der Abteilung der Ascomycota (p-Wert = 0,023). Gesunde und Patienten mit Morbus Crohn unterscheiden sich signifikant im Vorkommen der Gattung *Candida* (p-Wert







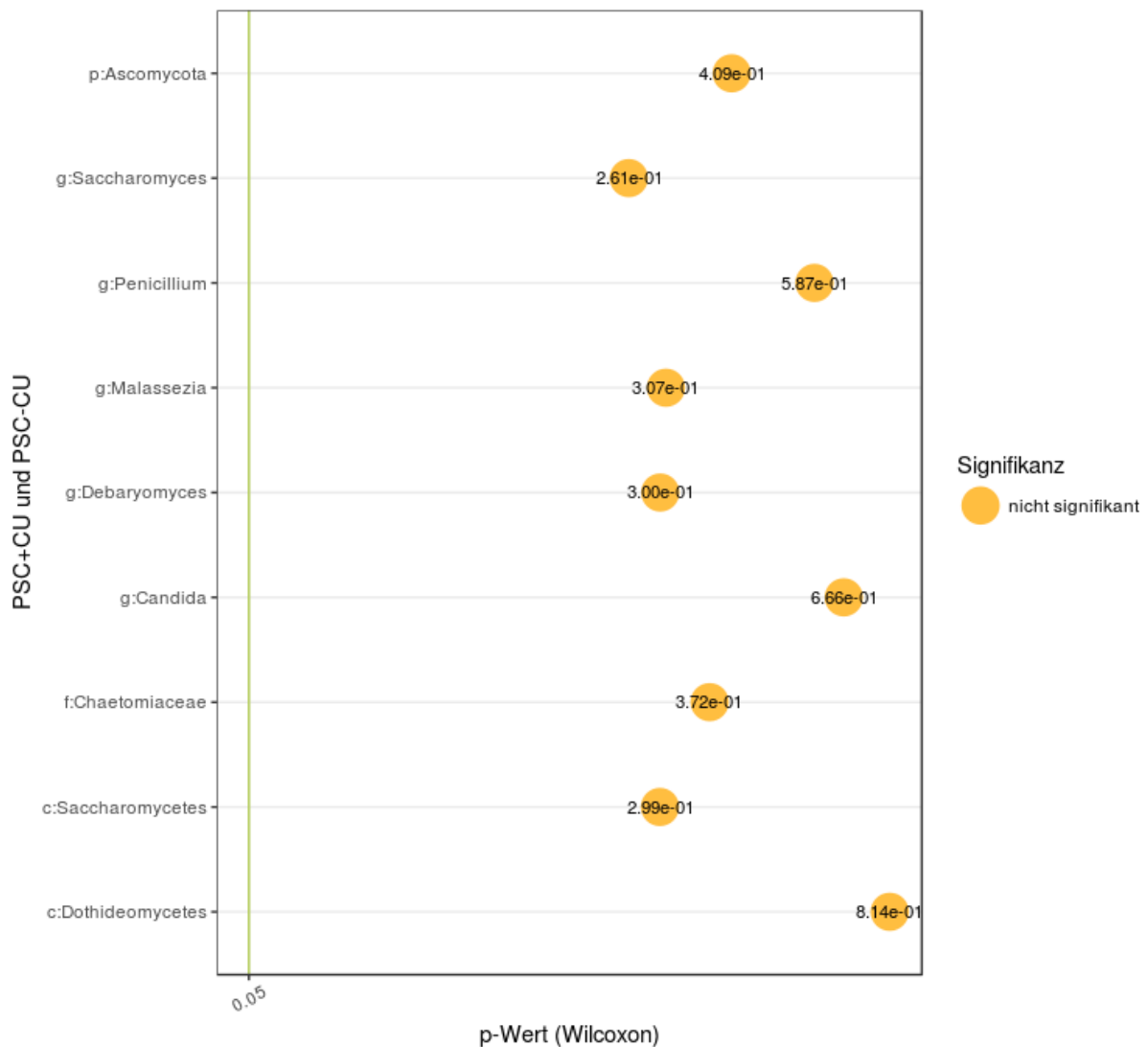


Abbildung 3.6: Vergleich zweier Gruppen im Vorkommen der jeweiligen Pilztaxa mithilfe des Wilcoxon-Rangsummentestes In der linken Spalte angegeben sind die jeweiligen Kohorten, die miteinander verglichen wurden. Links neben der Ordinate sind zunächst die verglichenen Kohorten angegeben, auf die sich die jeweilige Graphik bezieht. Auf der Ordinate selbst sind die jeweiligen Pilze aufgetragen, c steht für Klasse (class), f steht für Familie, g steht für Gattung und p steht für Abteilung (phylum). Auf der Abszisse ist der p-Wert aufgetragen mit der Null am rechten Ende der Achse und nach links hin kleiner werdenden Werten. Der p-Wert wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentestes errechnet um zu ermitteln, ob sich die Kohorten im Auftreten des jeweiligen Pilztaxons unterscheiden. P-Werte kleiner oder gleich 0,05, die zur Ablehnung der Nullhypothese führen und somit einen signifikanten Unterschied im Auftreten des Pilzes darstellen, sind mit einem grünen Punkt hinterlegt. P-Werte größer 0,05 sind mit einem gelben Punkt hinterlegt. Dargestellte Kohorten: Gesunde, MC = Individuen mit Morbus Crohn, CU = Individuen mit Colitis ulcerosa, PSC-CU = Individuen mit primär sklerosierender Cholangitis ohne gleichzeitiger Erkrankung an Colitis ulcerosa, PSC+CU = Individuen mit primär sklerosierender Cholangitis mit gleichzeitiger Erkrankung an Colitis ulcerosa.

$= 3,41 \times 10^{-05}$) und der Gattung *Debaryomyces* (p-Wert $= 2,58 \times 10^{-05}$). Patienten mit Colitis ulcerosa und Patienten mit Morbus Crohn unterscheiden sich nicht signifikant im Vorkommen der gefundenen Pilze. Patienten mit PSC und Patienten mit Morbus Crohn unterscheiden sich signifikant im Vorkommen der Klasse der Saccharomycetes (p-Wert $= 9,00 \times 10^{-04}$), der Familie der Chaetomiaceae (p-Wert $= 1,61 \times 10^{-10}$), der Gattung *Candida* (p-Wert $= 2,51 \times 10^{-04}$), der Gattung *Debaryomyces* (p-Wert $= 0,0556$), der Gattung *Malassezia* (p-Wert $= 0,002$) sowie der Abteilung der Ascomycota (p-Wert $= 2,83 \times 10^{-09}$). Patienten mit PSC und Colitis ulcerosa unterscheiden sich signifikant im Vorkommen der Klasse der Saccharomycetes (p-Wert $= 0,030$), der Familie der Chaetomiaceae (p-Wert $= 1,28 \times 10^{-09}$), der Gattung *Candida* (p-Wert $= 0,010$), der Gattung *Malassezia* (p-Wert $= 1,081 \times 10^{-04}$) sowie der Abteilung Ascomycota (p-Wert $= 8,34 \times 10^{-09}$). Teilt man die Patientengruppe der PSC-Patienten in die Erkrankten an PSC mit Auftreten von Colitis ulcerosa und die Erkrankten mit PSC ohne Auftreten von Colitis ulcerosa, unterschieden sich die Pilzpopulationen nicht signifikant. Abschließend lässt sich sagen, dass die größten Unterschiede bei der Gruppe der Patienten mit PSC gefunden werden konnten. Diese unterscheiden sich bezüglich aller anderen Gruppen im Vorkommen der Familie der Chaetomiaceae sowie dem Vorkommen der Gattung *Malassezia*. Des Weiteren unterscheiden sich sowohl die Patienten mit Morbus Crohn als auch die Patienten mit Colitis ulcerosa von den Patienten mit PSC und den Gesunden im Auftreten der Gattung *Candida* und der Gattung der *Debaryomyces* mit Ausnahme eines nicht signifikanten Unterschiedes zwischen den Patienten mit Colitis ulcerosa und PSC. Schlussendlich gilt es die gefundenen Ergebnisse im folgenden Teil näher zu betrachten und zu diskutieren.

3.4.3.3 Alpha- und Beta-Diversität

Die Alpha-Diversität misst die Artenvielfalt eines Lebensraumes. Im Rahmen dieser Arbeit ist der Lebensraum der Darm, bzw. genauer gesagt Darminhalt, eines Probanden. Die Beta-Diversität misst weiterhin den Unterschied der Artenvielfalt zwischen verschiedenen Proben. Im Rahmen dieser Arbeit lassen sich so die Artenvielfalten der Stuhlproben zweier Kohorten miteinander vergleichen. Die Alpha-Diversität selbst zählt alle vorhandenen Arten einer Probe. Es gibt jedoch auch verschiedene Methoden die Biodiversität unter Berücksichtigung der Abundanzen der Arten, bzw. deren relative Häufigkeiten zu errechnen. Eine Methode hiervon ist der Simpson-Index. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass zwei zufällig gewählte Individuen einer Probe der gleichen Art angehören. Er rangiert zwischen null und eins und nimmt mit zunehmender Diversität ab. Dementsprechend bedeutet ein Ergebnis von eins die vollständige Dominanz einer Spezies. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der inverse Simpson-Index verwendet, der folglich mit zunehmender Diversität steigt. Abb. 3.7 stellt so die Alpha-Diversität der Proben der einzelnen Kohorten dar.

Da die Literatur oftmals mit mehreren Indizes arbeitet um die Alpha-Diversität abzubilden, wurde in dieser Arbeit zusätzlich der Shannon-Index verwendet. Der Shannon-Index berücksichtigt neben der Anzahl der gefundenen Arten auch die Anzahl der Individuen je Art. Verteilen sich die detektierten Arten gleichmäßig, ist der errechnete Shannon-Index hoch, dominieren we-

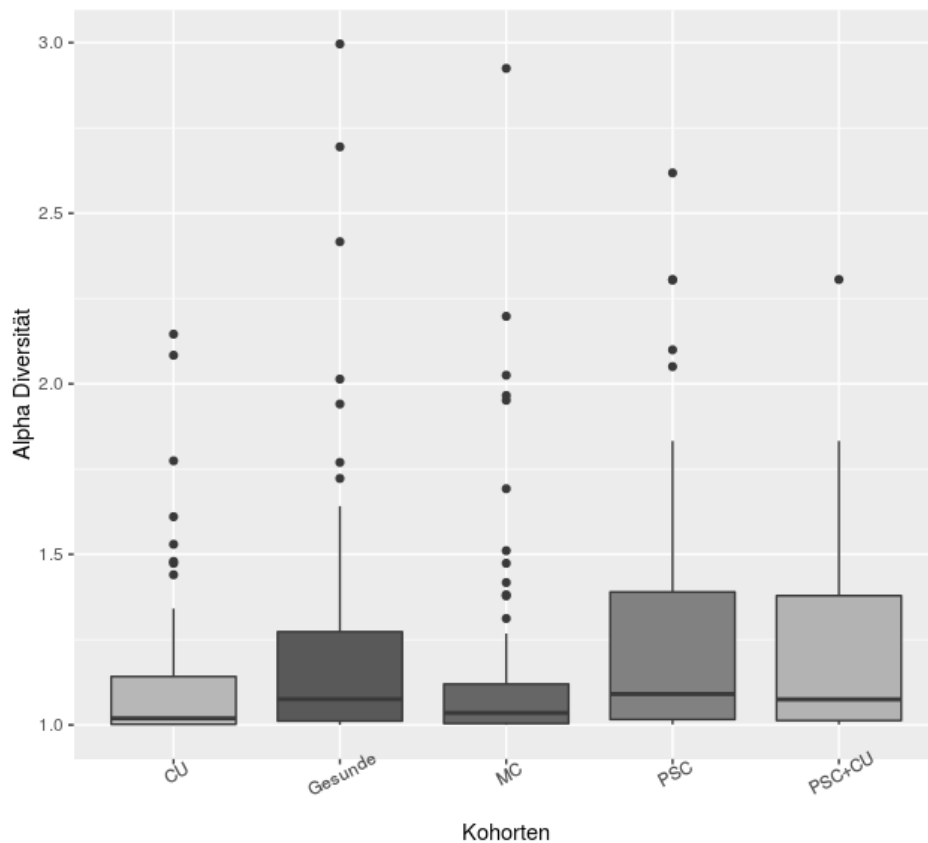


Abbildung 3.7: Parallele Darstellung der Alpha-Diversitäten mit Hilfe des inversen Simpson-Indexes der verschiedenen Kohorten. Auf der Ordinate ist die Alpha-Diversität in Form des inversen Simpson-Indexes aufgetragen. Die Abszisse enthält die verschiedenen Kohorten mit folgenden Abkürzungen: CU stehend für Colitis ulcerosa, MC für Morbus Crohn, PSC für primär sklerosierende Cholangitis (ohne dem Vorliegen von Colitis ulcerosa) und PSC+CU für primär sklerosierende Cholangitis mit gleichzeitigem Vorliegen von Colitis ulcerosa.

nige Arten in einer Probe, ist das Ergebnis niedrig. Daher ist der Shannon-Index auch ein Maß für die Verteilung der Arten in einem untersuchten Habitat.

Mittels des Wilcoxon-Rangsummentestes wurde überprüft, ob es signifikante Unterschiede zwischen den inversen Simpson-Indizes, bzw. den Shannon-Indizes der Kohorten gibt. Signifikante Unterschiede fanden sich zwischen Gesunden und Morbus Crohn-Patienten (p-Wert des Simpson-Indexes = 0,02564, p-Wert des Shannon-Indexes = 0,01885), Gesunden und Colitis ulcerosa-Patienten (p-Wert des Simpson-Indexes = 0,01133, p-Wert des Shannon-Indexes = 0,01035), Morbus Crohn-Patienten und Patienten mit PSC ohne gleichzeitigem Vorliegen von Colitis ulcerosa (p-Wert des Simpson-Indexes = 0,002727, p-Wert des Shannon-Indexes = 0,001049) sowie Colitis ulcerosa-Patienten und Patienten mit PSC ohne gleichzeitigem Vorliegen von Colitis ulcerosa (p-Wert des Simpson-Indexes = 0,001656, p-Wert des Shannon-Indexes = 0,001244). Aber auch Colitis ulcerosa-Patienten und Patienten mit PSC und gleichzeitigem Vorliegen von Colitis ulcerosa (p-Wert des Simpson-Indexes = 0,03452, p-Wert des Shannon-Indexes = 0,03286) unterschieden sich signifikant in ihren inversen Simpson-Indizes. Somit decken sich die Analysen der Alpha-Diversität mit Hilfe des inversen Simpson-Indexes und des Shannon-Indexes bezüglich ihrer Signifikanz.

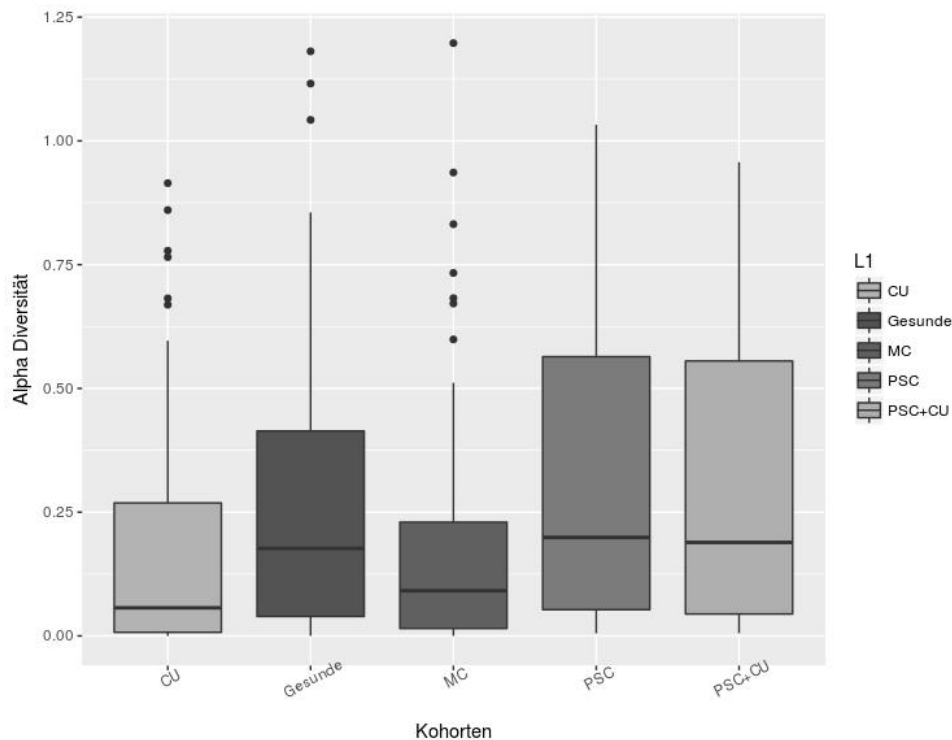


Abbildung 3.8: Darstellung des Shannon-Indexes zur Veranschaulichung der Alpha-Diversitäten der verschiedenen Kohorten. Auf der Ordinate ist die über den Shannon-Index errechnete Alpha-Diversität aufgetragen. Auf der Abszisse werden die einzelnen Kohorten parallel dargestellt. CU steht für Colitis ulcerosa, MC steht für Morbus Crohn, PSC steht für primär sklerosierende Cholangitis (ohne dem Vorliegen von Colitis ulcerosa) und PSC+CU steht für primär sklerosierende Cholangitis mit gleichzeitigem Vorliegen von Colitis ulcerosa.

Um die Beta-Diversität und somit die Artenvielfalt der Stuhlproben zweier Kohorten miteinander zu vergleichen, wurde eine Berechnung des Bray-Curtis-Indexes durchgeführt. Der Bray-Curtis-Index ist ein Maß der Verschiedenheit von Artengemeinschaften und reicht von null bis eins. Ein Index von null liegt bei vollkommen ähnlichen Artengemeinschaften vor und ein Index von eins bei vollkommen unterschiedlichen Artengemeinschaften. Anschließend wurde eine permutative multivariate Varianzanalyse (PERMANOVA) zwischen den Gruppen durchgeführt um zu prüfen, ob sich diese signifikant unterscheiden. Die PERMANOVA wird bezüglich der Beta-Diversität genutzt um die Nullhypothese „Die Kohorten unterscheiden sich nicht“ zu prüfen. Hierbei werden Permutationen der Proben der Kohorten durchgeführt um zu betrachten, ob eine zufällige Zuordnung mehr Varianz zwischen den Kohorten erklärt als die tatsächlichen Kohorten. Anschließend wird der Quotient aus der Anzahl der zufällig zugeordneten Permutationen, die eine größere Varianz als die tatsächlichen Kohorten aufweisen, mit der Anzahl der insgesamt durchgeführten Permutationen gebildet. Bei 1000 durchgeführten Permutationen und fünf Permutationen, die mehr Varianz als die echten Zuordnungen erklären, ergibt sich somit ein p-Wert von $5/1000 = 0,005$. Bei einem p-Wert von $< 0,5$ wird die Nullhypothese verworfen und es besteht ein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung und dem Schwerpunkt der Proben.

Tabelle 3.10: Bray-Curtis-Indizes zum Vergleich der Verschiedenheiten der Pilzgemeinschaften je zweier Kohorten. In der linken Spalte sowie der ersten Zeile sind die verschiedenen Kohorten angegeben. Hierbei finden sich die Kohorten der Gesunden, der Patienten mit Morbus Crohn (MC), der Patienten mit Colitis ulcerosa (CU), der Patienten mit PSC ohne einem Vorliegen von Colitis ulcerosa (PSC) und der Patienten mit PSC und gleichzeitigem Vorliegen von Colitis ulcerosa (PSC+CU). Anschließend ist zu jeder Kohortenkombination der errechnete Bray-Curtis-Index aufgetragen.

	MC	Gesunde	PSC	PSC+CU
Gesunde	0.22027326			
PSC	0.62124470	0.47661672		
PSC+CU	0.58580363	0.43586254	0.09096430	
CU	0,22757173	0,03879103	0,47162406	0.41648311

Die Ergebnisse der PERMANOVA ergaben jedoch keinen signifikanten Unterschied der ermittelten Bray-Curtis-Indizes.

Kapitel 4

Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines geeigneten Hochdurchsatzverfahrens um das Mykobiom sowohl gesunder Individuen zu charakterisieren als auch das Mykobiom erkrankter Individuen an einer CED oder PSC. Ansporn hierfür war die bislang unzulänglich verstandene Pathogenese dieser Erkrankungen sowie Hinweise auf eine Rolle pilzlicher Organismen hierin. Für die Gewinnung der Daten über das Hochdurchsatzverfahren war zunächst die Etablierung einer geeigneten DNA-Extraktionsmethode sowie einer geeigneten PCR zur Amplifikation der pilzlichen DNA erforderlich.

4.1 Die Methodik

4.1.1 Verwurf der nested-PCR

Durch das Benutzen der ITS1F- und ITS4-Primer im ersten Schritt der nested-PCR werden die ITS1- und ITS2-Regionen sowie das 5.8S-Gen, also die gesamte ITS-Region, amplifiziert. Dies führt zu einer starken Abweichung gegen Spezies mit längeren Amplicons (Ihrmark et al., 2012). Die Längenunterschiede sind bei der PCR wichtig, da die Amplifikation kürzerer Fragmente während der PCR bevorzugt wird. So liefern z.B. Basidiomycota bei der Amplifikation der gesamten ITS-Region signifikant längere Amplicons als Ascomycota (Bellemain et al., 2010). Manter and Vivanco (2007) zeigten außerdem, dass die mittlere Sequenzlänge der gesamten ITS-Region von Basidiomycota und Zygomycota länger ist als die der Ascomycota. Diese Längenunterschiede führen mit jedem Zyklus der PCR zu einer Verschiebung des Spektrums. Darüber hinaus führt eine Amplifikation der ITS1-, 5.8s-Gen- und ITS2-Region dazu, dass sich vermehrt Chimären bilden. Dies rührt daher, dass sich Teilfragmente von verschiedenen Templates an der konservierten Region des 5.8s-Gens verknüpfen können und es im weiteren Verlauf der PCR zu ihrer Amplifikation kommt. Dieses Problem ist bereits aus PCR-Analysen von Bakterien bekannt (Haas et al., 2011). So kam es bei der Amplifikation von Pilzsequenzen aus Insektenproben mit dem ITS1F/ITS4 Primerpaar zu einer Chimärenbildung von 19% (Ihrmark et al., 2012). Durch einen nested-PCR-Ansatz, der hiernach in einer zweiten PCR noch einmal die ITS1-Region amplifiziert, wird so das Spektrum der Pilze zusätzlich weiter verfälscht. Darüber hinaus besteht im Schritt der Aufreinigung zwischen der ersten und der zweiten PCR das Risiko einer Ver-

unreinigung. Dies wird dadurch unterstrichen, dass es einige Anläufe kostete um auch in der zweiten PCR der nested-PCR nach der Aufreinigung eine negative Negativkontrolle zu erhalten. Nachdem der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Vergleich der über die einfache oder die nested-PCR gewonnenen ITS1-Sequenzen keine signifikanten Unterschiede im Fisher-Test lieferte, wurde die ITS1-Region über die einfache PCR amplifiziert.

4.1.2 Eine PCR für die ITS1-Region oder die ITS2-Region?

Es konnte gezeigt werden, dass die Wahl der ITS-Subregion einen deutlichen Einfluss auf die taxonomische Zusammensetzung hat (Nilsson et al., 2009, Op De Beeck et al., 2014). So konnten Monard et al. (2013) in den ITS1- und ITS2-Datensätzen ähnliche taxonomische Kompositionen auf Abteilungs- und Ordnungsebene nachweisen, während auf Genus- und Speziesebene nur ein Drittel der OTUs in beiden Sets gefunden wurden. Auch Bazzicalupo et al. (2013) fanden auf Ordnungsebene noch 75% Gemeinsamkeiten, während es auf der Speziesebene nur noch 20,2% waren. Die verschiedenen Primer und die systematischen Längenunterschiede der ITS-Subregionen führen zu verschiedenen Amplifikationsraten der taxonomischen Gruppen (Bellemain et al., 2010, Op De Beeck et al., 2014). Die Längenunterschiede sind bei der PCR wichtig, da kürzere Fragmente während der PCR vermehrt amplifiziert werden. In prokaryotischen ribosomal small subunit (SSU) Amplicons wurde gezeigt, dass eine steigende Ampliconlänge einen signifikant negativen Effekt auf die Bewertung der Artenvielfalt hat. Zusätzlich beeinflusst sie deren Zusammensetzung (Ihrmark et al., 2012). Betrachtet man die ITS1-Region, liefern Non-Dikarya-Pilze signifikant kürzere Fragmente. Die Ampliconlänge von Ascomycota und Basidiomycota ist etwa gleich (Bellemain et al., 2010). In der ITS2-Region liefern Ascomycota jedoch kürzere Fragmente als Basidiomycota (Bellemain et al., 2010, Porter and Golding, 2011). Dennoch wurden Basidiomycota in unserer Analyse vermehrt über die ITS2-Region im Vergleich mit der ITS1-Region nachgewiesen. Auch wenn in der Untersuchung von Nilsson et al. (2009) die durchschnittliche Länge der beiden Subloci ungefähr gleich war, sind die genannten Längenunterschiede von Wichtigkeit, wenn es darum geht, eine genaue Erfassung aller Spezies zu erhalten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die ITS1-Region im Durchschnitt in den meisten Pilzstämmen variabler ist als die ITS2-Region (Nilsson et al., 2008). Dennoch lag bei 91% die Variabilität zwischen ITS1 und ITS2 bei $<0,5\%$ und der Korrelationskoeffizient der Variabilität zwischen ITS1 und ITS2 bei 0,87 (Nilsson et al., 2008). Nilsson et al. (2009) empfehlen die ITS2-Region als die bessere Wahl zur parallelen Sequenzierung. Die Entscheidung hierfür rührt daher, dass zum Einen mehr ITS2-Sequenzen in der International Nucleotide Sequence Database (INSD, besteht aus DNA Databank of Japan (DDBJ), GenBank (USA) und European Nucleotide Archive (UK)) hinterlegt sind. Zum Anderen ist die der ITS2-Region angegliederte 18S-Region hilfreicher in der Speziesidentifikation. Sie erlaubt mehr phylogenetische Rückschlüsse als die der ITS1 angegliederte 5.8S-Gen-Region. Jede zusätzlich sequenzierte Region an den ITS-Regionen könne somit dem Identifikationsprozess weiter helfen. Bei Bazzicalupo et al. (2013) und Op De Beeck et al. (2014) lieferte die ITS2-Region des Weiteren mehr OTU's. Monard et al. (2013) jedoch fanden eine größere pilzliche Diversität im ITS1-Datenset. Sie gehen jedoch davon aus, dass diese auch durch die hohe Rate an Falschanlagerungen des ITS1f Primers zustande kommt. Trotzdem

wurden einige Ordnungen und Familien nur in einem der beiden Datensets gefunden. Deshalb wird dazu geraten, bei einer Analyse, in der die Tiefe eine wichtige Rolle spielt, beide Regionen einzuschließen, um eine verlässlichere Einschätzung der pilzlichen Biodiversität zu erhalten (Bazzicalupo et al., 2013, Monard et al., 2013, Op De Beeck et al., 2014, Orgiazzi et al., 2012). In dieser Arbeit wurde jedoch dennoch die schlussendliche Analyse nur über die Amplifikation und Sequenzierung der ITS2-Region durchgeführt. Dies geschah aufgrund der schlechten Performance der etablierten PCR der ITS1-Region. So ergab die ITS1-Region in nur 4,2% aller Proben mehr als 5000 qualitativ ausreichende Sequenzen. Die ITS2-Region hingegen lieferte in 82,3% aller Proben mehr als 5000 qualitativ ausreichende Sequenzen. Auch die Ergebnisse von Op De Beeck et al. (2014) zeigten, dass das ITS1F/ITS2 Primerpaar durchschnittlich weniger Reads als zwei Primerpaare der ITS2-Region (ITS3/ITS4 und ITS86F/ITS4) lieferte.

Alles in allem beleuchten die genannten Punkte die Schwierigkeit sich für eine ITS-Region zu entscheiden. Hierbei spielt schlussendlich die jeweilige Fragestellung eine wichtige Rolle. Es sollte jedoch auch die etablierte PCR bezüglich ihrer Ergebnisse geprüft werden. So wäre für eine Tiefenanalyse vermutlich eine Sequenzierung der ITS1- und ITS2-Regionen in dieser Arbeit nötig. Liefert die etablierte PCR jedoch nicht die hierfür nötigen Ergebnisse, kann nicht mit beiden PCRs für die jeweiligen ITS-Regionen weitergearbeitet werden.

4.2 Die Datenanalyse

Da einige Pilzsequenzen in der INSD nur teilweise vorhanden sind, ist die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten zum Mykobiom nicht trivial. Das heißt, dass entweder die ITS1-Sequenz oder die ITS2-Sequenz bei einem Teil der Sequenzen komplett fehlen. Auch hierdurch kann eine Verzerrung der detektierten Pilzdiversität bei der vergleichenden Analyse zwischen der ITS1- und der ITS2-Region entstehen (Nilsson et al., 2009, Liguori et al., 2016). Des Weiteren zeigten Nilsson et al. (2006), dass etwa 20% der Pilz-DNA-Sequenzen von öffentlichen Sequenzdatenbasen den falschen Spezies zugeordnet wurden. Zusätzlich stimmen die ITS1- und die ITS2-Sequenzen oft in ihrer taxonomischen Zuordnung nicht überein. Somit wird je nach Betrachtung der ITS1- oder ITS2-Region die Eingabesequenz einer unterschiedlichen Spezies zugeordnet (Nilsson et al., 2009). Auch dies führt zu Fehlern in der Analyse. Limitierungen der ITS-Sequenzen in einigen Gruppen Spezies zu identifizieren oder das Versagen hierin kommen ebenfalls vor (Schoch et al., 2012). So gibt es z.B. ITS-Sequenzen, die in identischer Form von unterschiedlichen Spezies geteilt werden. Hierzu gehört z.B. der *Cladosporium herbarum*-Komplex (Schubert et al., 2007) und die Gattung *Aspergillus*. In ihr sind die ITS-Sequenzen verschiedener Komplexe mykotoxischer, industrieller und medizinisch wichtiger Spezies identisch und machen zusätzliche Marker zur Identifikation notwendig (Geiser et al., 2007). Weiterhin zeigte eine Analyse von Hibbett et al. (2011), dass 8-10% der untersuchten Sequenzen aus der GenBank Chimären waren. All diese Aspekte erschweren die Interpretation der gewonnenen Daten und müssen bei der Auswertung berücksichtigt werden.

4.3 Die Ergebnisse der Analysen der Kohorten

4.3.1 Das Mykobiom

Bislang sind in der Literatur nur wenige Studien des Mykobioms an weitestgehend kleinen Kollektiven beschrieben. Generell war die am häufigsten nachgewiesene Ordnung Saccharomycetales (Chehoud et al., 2015) und die am häufigsten nachgewiesenen Gattungen stellten *Saccharomyces*, *Candida* (Liguori et al., 2016, Ott et al., 2008b, Sokol et al., 2017), *Penicillium* (Ott et al., 2008b, Sokol et al., 2017), *Debaryomyces* (Liguori et al., 2016, Sokol et al., 2017), *Kluyveromyces* (Sokol et al., 2017), *Malassezia*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, *Wallemia* sowie unidentifizierte Filobasidiaceae und Xylariales (Liguori et al., 2016) dar. Bei gesunden Individuen war die mit der größten Prävalenz nachgewiesene Gattung *Saccharomyces* (in 89% präsent), gefolgt von *Candida* (57%) und *Cladosporium* (42%) (Hoffmann et al., 2013). Zudem zeigte sich im Vergleich eine signifikant erhöhte Abundanz an *Cladosporium* spp. (Chehoud et al., 2015). Bei CED-Patienten konnte in zwei Studien ein Rückgang der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* (Li et al., 2014a, Sokol et al., 2017) nachgewiesen werden, jedoch zeigten zwei weitere Studien eine Zunahme an Saccharomycetes (Liguori et al., 2016), bzw. Saccharomycetales (Mar et al., 2016). Des Weiteren wurde eine signifikant erhöhte Abundanz der Gattung *Candida* (Chehoud et al., 2015, Liguori et al., 2016, Li et al., 2014a, Mar et al., 2016, Zwolinska-Wcislo et al., 2009) bei CED-Patienten festgestellt. Eine andere Studie zeigte jedoch keinen Unterschied der Prävalenz an *Candida* spp. zwischen Gesunden und Morbus Crohn-Patienten (Bougnoux et al., 2006) und eine weitere zwar keinen krankheitsspezifischen Zusammenhang, jedoch eine Abundanzzunahme bei CED-Patienten, v.a. im Schub (Sokol et al., 2017). Darüber hinaus wurde eine Überrepräsentation an *Debaryomyces* (Mar et al., 2016), Exobasidiomycetes, Sordariomycetes, Cystofilobasidiaceae, *Dioszegia* und *Candida glabrata* sowie eine Abnahme der Gattungen *Leptosphaeria* und *Trichosporon* beobachtet. Interessanterweise nahm die Abundanz der Cystofilobasidiaceae im Schub im Gegensatz zur Remission weiter zu (Liguori et al., 2016). Außerdem fiel auf, dass die Abteilungen Ascomycota und Basidiomycota invers korreliert waren (Hoffmann et al., 2013, Sokol et al., 2017) und bei CED-Patienten eine erhöhte Abundanz an Basidiomycota gezeigt werden konnte, u.a. an *Malassezia* spp.. So war das Basidiomycota-zu-Ascomycota-Verhältnis unter einem Erkrankungsschub erhöht im Gegensatz zur Erkrankung in Remission (Sokol et al., 2017). Der Vergleich entzündeter und nicht entzündeter Areale der Darmmukosa von CED-Patienten erbrachte einen Anstieg an Pezizomycotina mit den Spezies *Gibberella moniliformis* und *Alternaria brassicicola*, einen Anstieg der Spezies *Cryptococcus neoformans* (Li et al., 2014a) sowie einen Anstieg der Ordnung Xylariales (Liguori et al., 2016) in den entzündeten Arealen. Im Gegensatz hierzu waren *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces castellii* in den entzündeten Arealen weniger präsent (Li et al., 2014a). Dafür zeigte sich eine Assoziation von *Saccharomyces cerevisiae* und *Filobasidium uniguttulatum* mit der nicht-entzündeten Mukosa (Liguori et al., 2016). *Candida albicans* und *Candida tropicalis* konnten ausschließlich in entzündeten Arealen nachgewiesen werden (Li et al., 2014a). Des Weiteren waren *Cladosporium cladosporioides*, *Raciborskiomyces longisetosum* und *Penicillium italicum* die einzigen Spezies, die sowohl in der Mukosa assoziierten Flora als auch im Stuhl gleichermaßen nachgewiesen werden konnten. *Sac-*

charomyces spp., *Candida glabrata* und die meisten *Penicillium* spp. konnten hingegen nur im Stuhl nachgewiesen werden (Ott et al., 2008b). Über das Mykobiom von PSC-Patienten liegen zum aktuellen Stand keine Daten vor.

4.3.2 Auswertung der Daten

4.3.2.1 Das Mykobiom von CED-Patienten

Die hier durchgeführte Untersuchung des Mykobioms zeigte, dass sich Probanden mit Morbus Crohn und Probanden mit Colitis ulcerosa sowohl von Gesunden, als auch von Probanden mit PSC signifikant im Vorkommen der Gattung *Candida* und der Gattung *Debaryomyces* unterscheiden. Einzig der Unterschied zwischen Probanden mit Colitis ulcerosa und Probanden mit PSC bezüglich des Vorkommens der Gattung *Debaryomyces* ist nicht signifikant. Die signifikant erniedrigte Prävalenz der *Candida* spp. steht im Widerspruch mit der aktuellen Datenlage, die entweder eine erhöhte Abundanz an *Candida* spp. zeigte oder *Candida* spp. nicht in allen Untersuchungen mit dem Krankheitsphänotyp in Einklang bringen konnte. *Candida* spp. stellen vor allem durch ihre Verbindung mit ASCA eine gut untersuchte Gattung in Zusammenhang mit CED dar. Ein vermindertes Vorkommen wurde bislang nicht berichtet. Da sich das Mykobiom sich in Remission befindlicher Patienten teilweise ähnlich gesunder Probanden verhält (Sokol et al., 2017), wäre es interessant den Krankheitsaktivitätsindex der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme zu kennen. Dies sollte in nähere Studien zur Betrachtung des Mykobioms einfließen. Jedoch ging es hier vorrangig um die Etablierung der Untersuchungsmethode. Zur genauen Rolle der *Debaryomyces* in CED gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Literatur, Mar et al. (2016) fanden jedoch eine deutlich erhöhte Abundanz an *Debaryomyces* bei Patienten mit einem besonders schweren Verlauf der Colitis ulcerosa. Des Weiteren stellen *Debaryomyces* eine der häufigsten detektierten Gattung des Mykobioms. Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen Colitis ulcerosa-Patienten und Gesunden fand sich in der Abteilung der Ascomycota. Diese Betrachtung ist zwar grob, jedoch steht die Abnahme der Prävalenz der Ascomycota in Einklang mit den vorliegenden Studien, die eine inverse Korrelation der Abteilungen Ascomycota und Basidiomycota zeigten mit einer Abnahme der Ascomycota bei CED-Patienten (Hoffmann et al., 2013, Sokol et al., 2017). Die einzige den Basidiomycota zugehörige Gattung *Malassezia* zeigte sich jedoch ebenfalls signifikant vermindert bei Colitis ulcerosa-Patienten. Hier stellt sich die Frage, inwieweit das von uns genutzte Verfahren geeignet ist das Mykobiom komplett zu erfassen und Basidiomycota zu detektieren oder ob es sich lediglich um unterschiedliche Ergebnisse handelt. Zuletzt fiel auf, dass unsere Ergebnisse keine Abnahme oder Zunahme der Klasse Saccharomycetes, noch der Gattung *Saccharomyces* zeigten. Dies steht im Kontrast mit zum aktuellen Zeitpunkt vorliegenden Studien, die eine Abundanzabnahme von *Saccharomyces cerevisiae* beschreiben (Li et al., 2014a, Sokol et al., 2017), aber auch eine Zunahme an Saccharomycetes (Liguori et al., 2016), bzw. Saccharomycetales (Mar et al., 2016). Bezüglich der Rolle der *Saccharomyces* zeigten Sivignon et al. (2015), dass *Saccharomyces cerevisiae* zur Reduktion einer Colitis induziert durch adhärente, invasive *Escherichia coli* führt. Auch eine Wiederherstellung der Darmwandbarriere konnte beobachtet werden. *Saccharomyces cerevisiae* stimuliert zudem eine vermehrte Produktion des antiinflammatorisch wirksamen Zytokins Interleukin-10

(Jawhara et al., 2012, Sokol et al., 2017). Die mit *Saccharomyces cerevisiae* verwandte *Saccharomyces boulardii*, eine probiotische Hefe, zeigte des Weiteren antiinflammatorische Effekte in verschiedenen Colitis-Tiermodellen (Jawhara and Poulain, 2007, Jawhara et al., 2012), sowie in einer systematische Betrachtung positive Effekte in der Prävention verschiedener Diarrhoe-Formen (McFarland, 2010) und in der Remissionsinduktion von Colitis ulcerosa (Guslandi et al., 2003). Woraus die Veränderungen der Saccharomycota bei CED resultiert, ist jedoch unklar.

Zuletzt lässt sich anmerken, dass sich laut Ott et al. (2008b) das Spektrum der gefundenen OTUs aus Stuhl signifikant von den gefundenen Mukosa-assoziierten OTUs unterscheidet. Mukosa-assoziierte Pilze werden durch das vorgestellte Hochdurchsatzverfahren mit der Verarbeitung von Stuhlproben jedoch nicht erfasst. Für eine Untersuchung des Mykobioms im Hinblick auf CED spielen Mukosa-assoziierte OTUs jedoch v.a. unter Berücksichtigung der erhöhten Darmwandpermeabilität ebenfalls eine wichtige Rolle. Dies wurde bereits auf bakterieller Ebene beschrieben (Kleessen et al., 2009, Swidsinski et al., 2002). Aber auch auf pilzlicher Ebene wurde ein Eindringen in die Mukosa nach Induktion einer Colitis beschrieben (Iliev et al., 2012, Zwolinska-Wcislo et al., 2009). Das entwickelte Hochdurchsatzverfahren wäre auf diesen Bereich anwendbar, gelänge die Extraktion pilzlicher DNA aus diesem Bereich. Diese Fragestellung wurde im Rahmen des Zieles pilzliche DNA aus Stuhl zu gewinnen und zu sequenzieren nicht adressiert. Sie ist jedoch wichtig und sollte ergänzend bearbeitet werden um die Rolle der Pilze in CED vollständig zu durchleuchten.

4.3.2.2 Das Mykobiom von PSC-Patienten

Die hier gefundenen Unterschiede des Mykobioms der PSC-Patienten verglichen mit den anderen Kohorten, stellen sicherlich den auffälligsten Befund dar. Patienten mit PSC unterscheiden sich signifikant sowohl von Gesunden, als auch von Probanden mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa im Vorkommen der Familie der Chaetomiaceae, der Gattung *Malassezia* und der Abteilung Ascomycota. Die größte Signifikanz weisen hier die Unterschiede in der Prävalenz der Chaetomiaceae auf. Sie konnten bei Gesunden in 33,3% gefunden werden, bei Patienten mit PSC und gleichzeitigem Vorliegen von Colitis ulcerosa in 83,3% und bei Patienten mit PSC ohne dem gleichzeitigem Vorliegen von Colitis ulcerosa in 81,8%. Bislang ist nicht viel über die Familie der Chaetomiaceae bekannt. *Chaetomium* spp. konnten in sehr seltenen Fällen mit Sinusitis (Aru et al., 1997), Pneumonie (Barron et al., 2003, Wang et al., 2016), Onychomykose (Aspiroz et al., 2007, Kim et al., 2013, Lagace and Cellier, 2012), Keratitis (Balne et al., 2012), intrazerebralem Abszess (Abbott et al., 1995), disseminierter invasiver Mykose (Barron et al., 2003, Slavin et al., 2015) und Phaeohyphomykose (Anandi et al., 1989) in Verbindung gebracht werden. Diese Infektionen stellen oftmals opportunistische Infektionen bei immunsupprimierten Individuen dar. Eine Rolle in Infektionen des Darmes und vor allem im Zusammenhang mit CED oder PSC wurde jedoch bislang nicht beschrieben. Die Rolle der Chaetomiaceae sollte daher in PSC-Patienten neu untersucht werden. Die signifikant erhöhte Prävalenz der Gattung *Malassezia* bei PSC-Patienten wurde bislang ebenfalls noch nicht beschrieben. Dafür wurde gezeigt, dass *Malassezia sympodialis* Mastzellen aktivieren kann und bei Immunglobulin E (IgE) sensitivierten Mastzellen u.a. zur Degranulation führt (Selander et al., 2009). Bei der Degranulation wird u.a.

Histamin freigesetzt. Zusätzlich konnte ein Protein namens „MGL_1304“ von *Malassezia globosa* identifiziert werden, welches ebenfalls die Mastzelldegranulation bewirkt und zur Verstärkung der Sensitivierung von Mastzellen durch IgE führt (Hiragun et al., 2013). Passend hierzu wurde bei PSC-Patienten eine Ansammlung an Mastzellen in Portalfeldern sowie deren Einwandern in das Gewebe um zerstörte Gallengänge gefunden (Ishii et al., 2005). Eine andere Studie beschrieb neben einer erhöhten Mastzellzahl bei PSC-Patienten, dass eine Verhinderung der bei Degranulation erfolgenden Histaminfreisetzung zu einer Abnahme der biliären Proliferation und Fibrosierung führte (Jones et al., 2016). Des Weiteren gibt es Hinweise auf erhöhte IgE-Level bei PSC-Patienten (Alangari et al., 2002, Hirano et al., 2008, Shimomura et al., 1996). Aufgrund der erhöhten Mastzell-Zahl mit Invasion des Gewebes um zerstörte Gallengänge und die nachgewiesene Mastzell-Aktivierung und Degranulation durch *Malassezia sympodialis* und *Malassezia globosa* sowie eine Verminderung der Fibrosierung bei Inhibition der Histaminfreisetzung durch Mastzellen, könnte hier eine mögliche Rolle der Gattung *Malassezia* in PSC vermutet werden. Hierfür werden jedoch weitere Untersuchungen benötigt sowie eine Bestätigung der Ergebnisse in einer weiteren unabhängigen Kohorte. Eine weitere Analyse des Mykobioms von PSC-Patienten ergab eine signifikant erhöhte Prävalenz an Ascomycota im Vergleich mit allen anderen Kohorten. Im Vergleich mit CED-Patienten fielen PSC-Patienten durch eine signifikante Zunahme an Saccharomycetes und *Candida* auf. Hier gibt es zumindest bezüglich der Gattung *Candida* eine Untersuchung, die diese in einigen PSC-Patienten in Verbindung mit einer schwereren Form der Cholangitis in Verbindung mit höheren CRP- und Bilirubin-Spiegeln brachte (Kulaksiz et al., 2006). Dennoch ist das Mykobiom von PSC-Patienten bislang noch weniger erforscht als das Mykobiom von CED-Patienten. Hier konnten bereits interessante Ergebnisse erzielt werden, die es weiterzuverfolgen gilt. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, da schon im Vergleich des hier detektierten Mykobioms von CED-Patienten mit den bislang beschriebenen Gattungen deutlich wird, wie viele Spezies in den hier untersuchten Probanden entweder nicht vorhanden waren oder aber vom etablierten Verfahren nicht detektiert werden konnten.

4.3.3 Die Biodiversität

Die aktuelle Datenlage zum Verhalten der Alpha- und Betadiversitäten bei CED-Patienten ist widersprüchlich. So konnte einerseits bei Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikant erhöhte Diversität (Ott et al., 2008b, Li et al., 2014a) und Abundanz an Pilzen nachgewiesen werden (Liguori et al., 2016, Ott et al., 2008b, Li et al., 2014a). Bei Patienten mit Colitis ulcerosa zeigte sich diese Tendenz ebenfalls, allerdings ohne ein signifikantes Niveau zu erreichen (Ott et al., 2008b). Im Gegensatz zu diesen Studien zeigten andere Studien eine signifikant verminderte Diversität (Chehoud et al., 2015, Liguori et al., 2016, Sokol et al., 2017) und Abundanz (Chehoud et al., 2015) bei CED-Patienten. Zum Verhalten der Diversitäten bei Patienten mit PSC gibt es aktuell keinerlei Daten bezüglich des Mykobioms. In dieser Studie wurden ebenfalls signifikant verminderte Diversitäten auf Seiten der CED-Probanden verglichen mit den gesunden Kontrollen festgestellt. Die Diversitäten auf Seiten der PSC-Patienten waren nicht signifikant verändert im Vergleich mit den gesunden Kontrollen. Ein signifikanter Unterschied wurde jedoch auch zwischen den Diversitäten der CED-Patienten und PSC-Patienten

ohne gleichzeitigem Vorliegen von Colitis ulcerosa gefunden in Form einer signifikant verminderten Diversität bei CED-Patienten. Interessanterweise kam es auch zu diesem Ergebnis im Vergleich zwischen Patienten mit Colitis ulcerosa und Patienten mit PSC und gleichzeitiger Erkrankung an Colitis ulcerosa. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die PSC wie von Loftus et al. (2005) vermutet einen eigenen CED-Phänotypen darstellen könnte.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gelang, ein Hochdurchsatzverfahren für den Nachweis von Pilzspuren in Stuhlproben über Amplifikation und Sequenzierung der ITS2-Region zu etablieren. Es ist jedoch schwer, eine absolute Aussage über das bei den untersuchten Gruppen beschriebene Mykobiom zu treffen. Dies hat verschiedene Gründe. Einerseits wurde nur eine der beiden ITS-Regionen näher untersucht, obwohl es in der Literatur Hinweise darauf gibt, dass über eine Betrachtung der ITS1- und ITS2-Regionen eine genauere und umfassendere Darstellung des Mykobioms gewonnen werden kann (Bazzicalupo et al., 2013, Monard et al., 2013, Op De Beeck et al., 2014, Orgiazzi et al., 2012). Da die ITS1-Sequenzierung großteils qualitativ nicht ausreichende Sequenzen lieferte, wurde sie jedoch aufgrund dessen verworfen. Nilsson et al. (2009) konnten jedoch die ITS2-Region besonders für die parallele Sequenzierung empfehlen. Da Primer anhand bestimmter Spezies designt werden, können sie nicht alle Spezies erfassen und haben Präferenzen sich an bestimmte Sequenzen anzulagern. Dies beinhaltet vor allem die Spezies, deren DNA-Sequenzen als Vorbild bei der Primerentwicklung genutzt wurden. So wurde der Primer ITS1-F beispielsweise speziell nach den Sequenzen von Basidiomycota designt (Gardes and Bruns, 1993). Des Weiteren ergeben sich Probleme sowohl durch die Pilzspezies, bei denen nur eine der beiden ITS-Regionen in der INSD vorhanden sind (Nilsson et al., 2009, Liguori et al., 2016) als auch durch das Vorliegen der den falschen Spezies zugewiesenen ITS-Sequenzen (Nilsson et al., 2006) oder als Spezies ausgewiesene Chimären (Hibbett et al., 2011). Hier wäre es wichtig, dass die fehlenden Sequenzen ergänzt werden und die Sequenzen der einzelnen Pilze abgeglichen werden. Zuletzt darf nicht in Vergessenheit geraten, dass Pilze nur einen äußerst geringen Anteil am Mikrobiom stellen, der sich im Stuhl auf 0,03% beläuft (Ott et al., 2008b). Eine PCR ist zwar geeignet auch geringe DNA-Spuren nachzuweisen, doch auch hier gibt es Grenzen. Bereits in der vorgeschalteten Extraktion könnte es zu einem DNA-Verlust kommen. Zudem wurden lediglich Pilzspuren aus dem Stuhl gewonnen. Zum Mykobiom, welches den aufgeführten geringen Anteil am Mikrobiom stellt, gehören jedoch auch die Mukosa-assoziierten Pilze, die sich von denen des Stuhles unterscheiden (Ott et al., 2008b) und in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden. Primer, die nicht nur pilzliche ITS-Sequenzen flankieren, sondern sich auch an pflanzlichen DNA-Sequenzen anlagern wie hier bei der Sequenzierung vor allem der ITS2-Sequenzen auffiel, führen zusätzlich dazu, dass in den laufenden Zyklen teilweise für den Betrachter unbedeutende Sequenzen amplifiziert werden, während eventuell pilzliche Sequen-

zen auf eine Amplifikation „warten“. Auch die unterschiedlichen Genlängen der Pilztaxa führen durch unterschiedliche Amplifikationsraten zu einer Verzerrung der Verhältnisse der gefundenen Sequenzen (Bellemain et al., 2010, Ihrmark et al., 2012, Op De Beeck et al., 2014). Weiterhin ist der in dieser Arbeit zugrunde gelegte Grenzwert von 5000 qualitativ ausreichenden Sequenzen je Sample deutlich strenger als z.B. in anderen Arbeiten wie von Op De Beeck et al. (2014) mit einem Grenzwert von 200 Sequenzen. Alles in allem lässt sich als bedeutsamstes Ergebnis der Unterschied des Mykobioms von PSC Patienten im Vergleich mit gesunden Probanden aufführen. Dieses Ergebnis sollte in weiteren Kohorten verifiziert und weiter verfolgt werden, da die Ätiologie dieser Erkrankung bis dato vollends unklar ist. Bezüglich der Ergebnisse der Analyse der CED-Patienten ergaben sich sowohl Übereinstimmungen als auch Diskrepanzen verglichen mit der Literatur. Dies war ebenfalls der Fall bei der Betrachtung der Biodiversität, bei der sich jedoch die Ergebnisse bereits vorliegender Literatur ebenfalls unterscheiden. Zuletzt ergaben sich auch hier interessanterweise Unterschiede bezüglich der Patienten mit PSC. Beim Vergleich der Biodiversität zwischen Patienten mit Colitis ulcerosa und Patienten mit PSC sowohl mit als auch ohne gleichzeitiger Erkrankung an Colitis ulcerosa fiel diesbezüglich eine signifikant verminderte Diversität der nur an Colitis ulcerosa erkrankten Patienten auf.

Literaturverzeichnis

- Abakar-Mahamat, A., Filippi, J., Pradier, C., Dozol, A., and Hebuterne, X. (2007). Incidence of inflammatory bowel disease in corsica from 2002 to 2003. *Gastroenterol Clin Biol*, 31(12):1098–103.
- Abbott, S. P., Sigler, L., McAleer, R., McGough, D. A., Rinaldi, M. G., and Mizell, G. (1995). Fatal cerebral mycoses caused by the ascomycete chaetomium strumarium. *J Clin Microbiol*, 33(10):2692–8.
- Agrawal, S., Gupta, S., and Agrawal, A. (2010). Human dendritic cells activated via dectin-1 are efficient at priming th17, cytotoxic cd8 t and b cell responses. *PLoS One*, 5(10):e13418.
- Alangari, A., Schneider, L., Geha, R. S., Nurko, S., and Bonilla, F. (2002). Primary sclerosing cholangitis in a patient with possible hyper-ige syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(1):S192–S192.
- Anandi, V., John, T. J., Walter, A., Shastry, J. C., Lalitha, M. K., Padhye, A. A., Ajello, L., and Chandler, F. W. (1989). Cerebral phaeohyphomycosis caused by chaetomium globosum in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol*, 27(10):2226–9.
- Arastéh, K., Baenkler, H., Bieber, C., Brandt, R., and Chatterjee, T. (2012). *Duale Reihe Innere Medizin*. Thieme.
- Arin Letamendia, A., Borda Celaya, F., Burusco Paternain, M. J., Prieto Martinez, C., Martinez Echeverria, A., Elizalde Apestegui, I., Laiglesia Izquierdo, M., Macias Mendizabal, E., Tamburri Moso, P., and Sanchez Valverde, F. (2008). [high incidence rates of inflammatory bowel disease in navarra (spain). results of a prospective, population-based study]. *Gastroenterol Hepatol*, 31(3):111–6.
- Aru, A., Munk-Nielsen, L., and Federspiel, B. H. (1997). The soil fungus chaetomium in the human paranasal sinuses. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 254(7):350–2.
- Aspiroz, C., Gene, J., Rezusta, A., Charlez, L., and Summerbell, R. C. (2007). First spanish case of onychomycosis caused by chaetomium globosum. *Med Mycol*, 45(3):279–82.
- Balasubramanian, S. (2011). Sequencing nucleic acids: from chemistry to medicine. *Chem Commun (Camb)*, 47(26):7281–6.

- Balne, P. K., Nalamada, S., Kodiganti, M., and Taneja, M. (2012). Fungal keratitis caused by *chaetomium atrobrunneum*. *Cornea*, 31(1):94–5.
- Bambha, K., Kim, W. R., Talwalkar, J., Torgerson, H., Benson, J. T., Therneau, T. M., Loftus, E. V., J., Yawn, B. P., Dickson, E. R., and Melton, L. J., r. (2003). Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a united states community. *Gastroenterology*, 125(5):1364–9.
- Bariola, J. R., Hage, C. A., Durkin, M., Bensadoun, E., Gubbins, P. O., Wheat, L. J., and Bradsher, R. W., J. (2011). Detection of blastomyces dermatitidis antigen in patients with newly diagnosed blastomycosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 69(2):187–91.
- Barrett, J. C., Hansoul, S., Nicolae, D. L., Cho, J. H., Duerr, R. H., Rioux, J. D., Brant, S. R., Silverberg, M. S., Taylor, K. D., Barmada, M. M., Bitton, A., Dassopoulos, T., Datta, L. W., Green, T., Griffiths, A. M., Kistner, E. O., Murtha, M. T., Regueiro, M. D., Rotter, J. I., Schumm, L. P., Steinhart, A. H., Targan, S. R., Xavier, R. J., Consortium, N. I. G., Libioulle, C., Sandor, C., Lathrop, M., Belaiche, J., Dewit, O., Gut, I., Heath, S., Laukens, D., Mni, M., Rutgeerts, P., Van Gossum, A., Zelenika, D., Franchimont, D., Hugot, J. P., de Vos, M., Vermeire, S., Louis, E., Belgian-French, I. B. D. C., Wellcome Trust Case Control, C., Cardon, L. R., Anderson, C. A., Drummond, H., Nimmo, E., Ahmad, T., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Fisher, S. A., Marchini, J., Ghor, J., Bumpstead, S., Gwilliam, R., Tremelling, M., Deloukas, P., Mansfield, J., Jewell, D., Satsangi, J., Mathew, C. G., Parkes, M., Georges, M., and Daly, M. J. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for crohn’s disease. *Nat Genet*, 40(8):955–62.
- Barron, M. A., Sutton, D. A., Vee, R., Guarro, J., Rinaldi, M., Thompson, E., Cagnoni, P. J., Moultny, K., and Madinger, N. E. (2003). Invasive mycotic infections caused by *chaetomium perlucidum*, a new agent of cerebral phaeohyphomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11):5302–5307.
- Baumgart, D. C. (2009). The diagnosis and treatment of crohn’s disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int*, 106(8):123–33.
- Bazzicalupo, A. L., Bálint, M., and Schmitt, I. (2013). Comparison of its1 and its2 rdna in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology*, 6(1):102–109.
- Beck-Sague, C. and Jarvis, W. R. (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the united states, 1980-1990. national nosocomial infections surveillance system. *J Infect Dis*, 167(5):1247–51.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., and Kauserud, H. (2010). Its as an environmental dna barcode for fungi: an in silico approach reveals potential per biases. *BMC Microbiol*, 10:189.
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. M., and Kauserud, H. (2013). Its1 versus its2 as dna metabarcodes for fungi. *Mol Ecol Resour*, 13(2):218–24.

- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot*, 98(3):426–38.
- Boonstra, K., van Erpecum, K. J., van Nieuwkerk, K. M., Drenth, J. P., Poen, A. C., Witteman, B. J., Tuynman, H. A., Beuers, U., and Ponsioen, C. Y. (2012). Primary sclerosing cholangitis is associated with a distinct phenotype of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 18(12):2270–6.
- Bosshard, P. P. (2011). Incubation of fungal cultures: how long is long enough? *Mycoses*, 54(5):e539–45.
- Botterel, F., Angebault, C., Cabaret, O., Stressmann, F. A., Costa, J. M., Wallet, F., Wallaert, B., Bruce, K., and Delhaes, L. (2017). Fungal and bacterial diversity of airway microbiota in adults with cystic fibrosis: Concordance between conventional methods and ultra-deep sequencing, and their practical use in the clinical laboratory. *Mycopathologia*.
- Bougnoux, M. E., Diogo, D., Francois, N., Sendid, B., Veirmeire, S., Colombel, J. F., Bouchier, C., Van Kruiningen, H., d’Enfert, C., and Poulain, D. (2006). Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of candida albicans isolates from the human digestive tract. *J Clin Microbiol*, 44(5):1810–20.
- Brown, G. D. and Gordon, S. (2001). Immune recognition. a new receptor for beta-glucans. *Nature*, 413(6851):36–7.
- Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S., and Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 197(9):1119–24.
- Brun, S., Bouchara, J. P., Bocquel, A., Basile, A. M., Contet-Audonneau, N., and Chabasse, D. (2001). Evaluation of five commercial sabouraud gentamicin-chloramphenicol agar media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 20(10):718–23.
- Brzozowski, T., Zwolinska-Wcislo, M., Konturek, P. C., Kwiecien, S., Drozdowicz, D., Konturek, S. J., Stachura, J., Budak, A., Bogdal, J., Pawlik, W. W., and Hahn, E. G. (2009). Influence of gastric colonization with candida albicans on ulcer healing in rats: Effect of ranitidine, aspirin and probiotic therapy. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 40(3):286–296.
- Buckland, M. S., Mylonaki, M., Rampton, D., and Longhurst, H. J. (2005). Serological markers (anti-saccharomyces cerevisiae mannan antibodies and antineutrophil cytoplasmic antibodies) in inflammatory bowel disease: diagnostic utility and phenotypic correlation. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(11):1328–30.
- Buhner, S., Buning, C., Genschel, J., Kling, K., Herrmann, D., Dignass, A., Kuechler, I., Krueger, S., Schmidt, H. H., and Lochs, H. (2006). Genetic basis for increased intestinal permeability in families with crohn’s disease: role of card15 3020insc mutation? *Gut*, 55(3):342–7.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., and Holmes, S. P. (2016). Dada2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nat Methods*, 13(7):581–3.

- Chan, W., Shim, H. H., Lim, M. S., Sawadjaan, F. L. B., Isaac, S. P., Chuah, S. W., Leong, R., and Kong, C. (2017). Symptoms of anxiety and depression are independently associated with inflammatory bowel disease-related disability. *Dig Liver Dis*, 49(12):1314–1319.
- Chehoud, C., Albenberg, L. G., Judge, C., Hoffmann, C., Grunberg, S., Bittinger, K., Baldassano, R. N., Lewis, J. D., Bushman, F. D., and Wu, G. D. (2015). Fungal signature in the gut microbiota of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21(8):1948–56.
- Chen, Y., Chen, Z., Guo, R., Chen, N., Lu, H., Huang, S., Wang, J., and Li, L. (2011). Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis b virus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70(4):492–8.
- Chiba, M. (2010). Lifestyle-related disease in crohn’s disease: Relapse prevention by a semi-vegetarian diet. *World Journal of Gastroenterology*, 16(20).
- Chouraki, V., Savoye, G., Dauchet, L., Vernier-Massouille, G., Dupas, J. L., Merle, V., Labe-renne, J. E., Salomez, J. L., Lerebours, E., Turck, D., Cortot, A., Gower-Rousseau, C., and Colombel, J. F. (2011). The changing pattern of crohn’s disease incidence in northern france: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2007). *Aliment Pharmacol Ther*, 33(10):1133–42.
- Chu, Y. J., Yang, H. I., Wu, H. C., Liu, J., Wang, L. Y., Lu, S. N., Lee, M. H., Jen, C. L., You, S. L., Santella, R. M., and Chen, C. J. (2017). Aflatoxin b1 exposure increases the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis b virus carriers. 141(4):711–720.
- Claessen, M. M., Vleggaar, F. P., Tytgat, K. M., Siersema, P. D., and van Buuren, H. R. (2009). High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol*, 50(1):158–64.
- Cocolin, L., Bisson, L. F., and Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS microbiology letters*, 189:81–87.
- Cornish, J. A., Tan, E., Simillis, C., Clark, S. K., Teare, J., and Tekkis, P. P. (2008). The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 103(9):2394–400.
- De Francesco, M. A., Piccinelli, G., Gelmi, M., Gargiulo, F., Ravizzola, G., Pinsi, G., Peroni, L., Bonfanti, C., and Caruso, A. (2017). Invasive candidiasis in brescia, italy: Analysis of species distribution and antifungal susceptibilities during seven years. *Mycopathologia*, 182(9-10):897–905.
- Delhaes, L., Monchy, S., Frealle, E., Hubans, C., Salleron, J., Leroy, S., Prevotat, A., Wallet, F., Wallaert, B., Dei-Cas, E., Sime-Ngando, T., Chabe, M., and Viscogliosi, E. (2012). The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community—implications for therapeutic management. *PLoS One*, 7(4):e36313.

- Dickie, I. A., Xu, B., and Koide, R. T. (2002). Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by t-rflp analysis. *New Phytologist*, 156(3):527–535.
- DiSalvo, A. F., Sekhon, A. S., Land, G. A., and Fleming, W. H. (1980). Evaluation of the exoantigen test for identification of histoplasma species and coccidioides immitis cultures. *J Clin Microbiol*, 11(3):238–41.
- Dohm, J. C., Lottaz, C., Borodina, T., and Himmelbauer, H. (2008). Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput dna sequencing. *Nucleic Acids Res*, 36(16):e105.
- Dominic, R. S., Prashanth, H., Shenoy, S., and Baliga, S. (2009). Diagnostic value of latex agglutination in cryptococcal meningitis. *J Lab Physicians*, 1(2):67–8.
- Dotan, I., Fishman, S., Dgani, Y., Schwartz, M., Karban, A., Lerner, A., Weishauss, O., Spector, L., Shtevi, A., Altstock, R. T., Dotan, N., and Halpern, Z. (2006). Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in crohn’s disease. *Gastroenterology*, 131(2):366–78.
- Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., and Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (ibd). *Clin Exp Immunol*, 102(3):448–55.
- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhart, A. H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L. W., Kistner, E. O., Schumm, L. P., Lee, A. T., Gregersen, P. K., Barmada, M. M., Rotter, J. I., Nicolae, D. L., and Cho, J. H. (2006). A genome-wide association study identifies il23r as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314(5804):1461–3.
- Eaden, J. A., Abrams, K. R., and Mayberry, J. F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 48(4):526–35.
- Economou, M., Filis, G., Tsianou, Z., Alamanos, J., Kogevinas, A., Masalas, K., Petrou, A., and Tsianos, E. V. (2007). Crohn’s disease incidence evolution in north-western greece is not associated with alteration of nod2/card15 variants. *World J Gastroenterol*, 13(38):5116–20.
- Evaldson, G., Heimdahl, A., Kager, L., and Nord, C. E. (1982). The normal human anaerobic microflora. *Scand J Infect Dis Suppl*, 35:9–15.
- Eyerich, K., Foerster, S., Rombold, S., Seidl, H. P., Behrendt, H., Hofmann, H., Ring, J., and Traidl-Hoffmann, C. (2008). Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of th17-associated cytokines il-17 and il-22. *J Invest Dermatol*, 128(11):2640–5.
- Feng, X., Ling, B., Yang, X., Liao, W., Pan, W., and Yao, Z. (2015). Molecular identification of candida species isolated from onychomycosis in shanghai, china. *Mycopathologia*, 180(5-6):365–71.

- Ferrante, M., Henckaerts, L., Joossens, M., Pierik, M., Joossens, S., Dotan, N., Norman, G. L., Altstock, R. T., Van Steen, K., Rutgeerts, P., Van Assche, G., and Vermeire, S. (2007). New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut*, 56(10):1394–403.
- Forcione, D. G., Rosen, M. J., Kisiel, J. B., and Sands, B. E. (2004). Anti-saccharomyces cerevisiae antibody (asca) positivity is associated with increased risk for early surgery in crohn’s disease. *Gut*, 53(8):1117–22.
- Foxman, B., Muraglia, R., Dietz, J. P., Sobel, J. D., and Wagner, J. (2013). Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 european countries and the united states: results from an internet panel survey. *J Low Genit Tract Dis*, 17(3):340–5.
- Franke, A., McGovern, D. P., Barrett, J. C., Wang, K., Radford-Smith, G. L., Ahmad, T., Lees, C. W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., Anderson, C. A., Bis, J. C., Bumpstead, S., Ellinghaus, D., Festen, E. M., Georges, M., Green, T., Haritunians, T., Jostins, L., Latiano, A., Mathew, C. G., Montgomery, G. W., Prescott, N. J., Raychaudhuri, S., Rotter, J. I., Schumm, P., Sharma, Y., Simms, L. A., Taylor, K. D., Whiteman, D., Wijmenga, C., Baldassano, R. N., Barclay, M., Bayless, T. M., Brand, S., Buning, C., Cohen, A., Colombel, J. F., Cottone, M., Stronati, L., Denson, T., De Vos, M., D’Inca, R., Dubinsky, M., Edwards, C., Florin, T., Franchimont, D., Gearry, R., Glas, J., Van Gossom, A., Guthery, S. L., Halfvarson, J., Verspaget, H. W., Hugot, J. P., Karban, A., Laukens, D., Lawrance, I., Lemann, M., Levine, A., Libioulle, C., Louis, E., Mowat, C., Newman, W., Panes, J., Phillips, A., Proctor, D. D., Regueiro, M., Russell, R., Rutgeerts, P., Sanderson, J., Sans, M., Seibold, F., Steinhart, A. H., Stokkers, P. C., Torkvist, L., Kullak-Ublick, G., Wilson, D., Walters, T., Targan, S. R., Brant, S. R., Rioux, J. D., D’Amato, M., Weersma, R. K., Kugathasan, S., Griffiths, A. M., Mansfield, J. C., Vermeire, S., Duerr, R. H., Silverberg, M. S., Satsangi, J., Schreiber, S., Cho, J. H., Annese, V., Hakonarson, H., Daly, M. J., and Parkes, M. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed crohn’s disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 42(12):1118–25.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52(1):65–70.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S., and Underhill, D. M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. *J Exp Med*, 197(9):1107–17.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. (1993). Its primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*, 2(2):113–8.
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., and Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in aspergillus. *Stud Mycol*, 59:1–10.
- Gheorghe, C., Pascu, O., Gheorghe, L., Iacob, R., Dumitru, E., Tantau, M., Vadan, R., Goldis, A., Balan, G., Iacob, S., Dobru, D., and Saftoiu, A. (2004). Epidemiology of inflammatory

- bowel disease in adults who refer to gastroenterology care in romania: a multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 16(11):1153–9.
- Gibson, T. B., Ng, E., Ozminkowski, R. J., Wang, S., Burton, W. N., Goetzel, R. Z., and Maclean, R. (2008). The direct and indirect cost burden of crohn’s disease and ulcerative colitis. *J Occup Environ Med*, 50(11):1261–72.
- Ginter-Hanselmayer, G., Smolle, J., and Gupta, A. (2004). Itraconazole in the treatment of tinea capitis caused by *microsporum canis*: experience in a large cohort. *Pediatr Dermatol*, 21(4):499–502.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287):546, 563–7.
- Gosiewski, T., Salamon, D., Szopa, M., Sroka, A., Malecki, M. T., and Bulanda, M. (2014). Quantitative evaluation of fungi of the genus *candida* in the feces of adult patients with type 1 and 2 diabetes - a pilot study. *Gut Pathog*, 6(1):43.
- Gouba, N., Raoult, D., and Drancourt, M. (2013). Plant and fungal diversity in gut microbiota as revealed by molecular and culture investigations. *PLoS One*, 8(3):e59474.
- Greenstein, A. J., Janowitz, H. D., and Sachar, D. B. (1976). The extra-intestinal complications of crohn’s disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine (Baltimore)*, 55(5):401–12.
- Griffith, G. W., Ozkose, E., Theodorou, M. K., and Davies, D. R. (2009). Diversity of anaerobic fungal populations in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. *Fungal Ecology*, 2(2):87–97.
- Gringhuis, S. I., Kaptein, T. M., Wevers, B. A., Theelen, B., van der Vlist, M., Boekhout, T., and Geijtenbeek, T. B. (2012). Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of il-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nat Immunol*, 13(3):246–54.
- Groll, A. H., Shah, P. M., Mentzel, C., Schneider, M., Just-Nuebling, G., and Huebner, K. (1996). Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect*, 33(1):23–32.
- Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., Herwaldt, L., Pfaller, M., and Diekema, D. (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*, 37(9):1172–7.
- Guevara-Suarez, M., Cano-Lira, J. F., de Garcia, M. C., Sopo, L., De Bedout, C., Cano, L. E., Garcia, A. M., Motta, A., Amezcua, A., Cardenas, M., Espinel-Ingroff, A., Guarro, J., Restrepo, S., and Celis, A. (2016). Genotyping of *fusarium* isolates from onychomycoses in colombia: Detection of two new species within the *fusarium solani* species complex and in vitro antifungal susceptibility testing. *Mycopathologia*, 181(3-4):165–74.

- Guo, J., Xu, N., Li, Z., Zhang, S., Wu, J., Kim, D. H., Sano Marma, M., Meng, Q., Cao, H., Li, X., Shi, S., Yu, L., Kalachikov, S., Russo, J. J., Turro, N. J., and Ju, J. (2008). Four-color dna sequencing with 3'-o-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(27):9145–50.
- Guslandi, M., Giollo, P., and Testoni, P. A. (2003). A pilot trial of *saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15(6):697–8.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methe, B., DeSantis, T. Z., Human Microbiome, C., Petrosino, J. F., Knight, R., and Birren, B. W. (2011). Chimeric 16s rna sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced pcr amplicons. *Genome Res*, 21(3):494–504.
- He, D., Hao, J., Zhang, B., Yang, Y., Song, W., Zhang, Y., Yokoyama, K., and Wang, L. (2011). Pathogenic spectrum of fungal keratitis and specific identification of *fusarium solani*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(5):2804–8.
- Hedayati, M. T., Taheri, Z., Galinimoghadam, T., Aghili, S. R., Yazdani Cherati, J., and Mosayebi, E. (2015). Isolation of different species of candida in patients with vulvovaginal candidiasis from sari, iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(4).
- Herre, J., Marshall, A. S., Caron, E., Edwards, A. D., Williams, D. L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S., and Brown, G. D. (2004). Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood*, 104(13):4038–45.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lucking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., and Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res*, 111(Pt 5):509–47.
- Hibbett, D. S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P., and Nilsson, R. H. (2011). Progress in molecular and morphological taxon discovery in fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, 25(1):38–47.
- Hiragun, T., Ishii, K., Hiragun, M., Suzuki, H., Kan, T., Mihara, S., Yanase, Y., Bartels, J., Schroder, J. M., and Hide, M. (2013). Fungal protein mgl.1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol*, 132(3):608–615 e4.

- Hirano, K., Tada, M., Isayama, H., Yashima, Y., Yagioka, H., Sasaki, T., Kogure, H., Togawa, O., Arizumi, T., Matsubara, S., Nakai, Y., Sasahira, N., Tsujino, T., Kawabe, T., and Omata, M. (2008). Clinical features of primary sclerosing cholangitis with onset age above 50 years. *J Gastroenterol*, 43(9):729–33.
- Hoarau, G., Mukherjee, P. K., Gower-Rousseau, C., Hager, C., Chandra, J., Retuerto, M. A., Neut, C., Vermeire, S., Clemente, J., Colombel, J. F., Fujioka, H., Poulain, D., Sendid, B., and Ghannoum, M. A. (2016). Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial crohn’s disease. *MBio*, 7(5).
- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., and Bushman, F. D. (2013). Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One*, 8(6):e66019.
- Holtta, V., Klemetti, P., Sipponen, T., Westerholm-Ormio, M., Kociubinski, G., Salo, H., Rasanen, L., Kolho, K. L., Farkkila, M., Savilahti, E., and Vaarala, O. (2008). Il-23/il-17 immunity as a hallmark of crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis*, 14(9):1175–84.
- Homa, M., Shobana, C. S., Singh, Y. R., Manikandan, P., Selvam, K. P., Kredics, L., Narendran, V., Vagvolgyi, C., and Galgoczy, L. (2013). Fusarium keratitis in south india: causative agents, their antifungal susceptibilities and a rapid identification method for the fusarium solani species complex. *Mycoses*, 56(5):501–11.
- Hopkins, J. M. and Land, G. A. (1977). Rapid method for determining nitrate utilization by yeasts. *J Clin Microbiol*, 5(4):497–500.
- Hueber, W., Sands, B. E., Lewitzky, S., Vandemeulebroecke, M., Reinisch, W., Higgins, P. D., Wehkamp, J., Feagan, B. G., Yao, M. D., Karczewski, M., Karczewski, J., Pezous, N., Bek, S., Bruin, G., Mellgard, B., Berger, C., Londei, M., Bertolino, A. P., Tougas, G., Travis, S. P., and Secukinumab in Crohn’s Disease Study, G. (2012). Secukinumab, a human anti-il-17a monoclonal antibody, for moderate to severe crohn’s disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*, 61(12):1693–700.
- Huppert, M., Harper, G., Sun, S. H., and Delanerolle, V. (1975). Rapid methods for identification of yeasts. *J Clin Microbiol*, 2(1):21–34.
- Ihrmark, K., Bodeker, I. T., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandstrom-Durling, M., Clemmensen, K. E., and Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal its2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 82(3):666–77.
- Iliev, I. D., Funari, V. A., Taylor, K. D., Nguyen, Q., Reyes, C. N., Strom, S. P., Brown, J., Becker, C. A., Fleshner, P. R., Dubinsky, M., Rotter, J. I., Wang, H. L., McGovern, D. P., Brown, G. D., and Underhill, D. M. (2012). Interactions between commensal fungi and the c-type lectin receptor dectin-1 influence colitis. *Science*, 336(6086):1314–7.

- Ishii, M., Iwai, M., Harada, Y., Morikawa, T., Okanou, T., Kishikawa, T., Tsuchihashi, Y., Hanai, K., and Arizono, N. (2005). A role of mast cells for hepatic fibrosis in primary sclerosing cholangitis. *Hepatol Res*, 31(3):127–31.
- Israeli, E., Grotto, I., Gilburd, B., Balicer, R. D., Goldin, E., Wiik, A., and Shoenfeld, Y. (2005). Anti-saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut*, 54(9):1232–6.
- Jacobsen, B. A., Fallingborg, J., Rasmussen, H. H., Nielsen, K. R., Drewes, A. M., Puho, E., Nielsen, G. L., and Sorensen, H. T. (2006). Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 18(6):601–6.
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H. T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A. E., Amtoft, A., Stajich, J. E., Hosaka, K., Sung, G. H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J. M., Slot, J. C., Wang, Z., Wilson, A. W., Schussler, A., Longcore, J. E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P. M., Powell, M. J., Taylor, J. W., White, M. M., Griffith, G. W., Davies, D. R., Humber, R. A., Morton, J. B., Sugiyama, J., Rossman, A. Y., Rogers, J. D., Pfister, D. H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R. A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R. A., Serdani, M., Crous, P. W., Hughes, K. W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W. A., Lucking, R., Budel, B., Geiser, D. M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D. S., Lutzoni, F., McLaughlin, D. J., Spatafora, J. W., and Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113):818–22.
- Jawhara, S., Habib, K., Maggioro, F., Pignede, G., Vandekerckove, P., Maes, E., Dubuquoy, L., Fontaine, T., Guerardel, Y., and Poulain, D. (2012). Modulation of intestinal inflammation by yeasts and cell wall extracts: strain dependence and unexpected anti-inflammatory role of glucan fractions. *PLoS One*, 7(7):e40648.
- Jawhara, S. and Poulain, D. (2007). Saccharomyces boulardii decreases inflammation and intestinal colonization by candida albicans in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med Mycol*, 45(8):691–700.
- Jawhara, S., Thuru, X., Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Mordon, S., Sendid, B., Desreumaux, P., and Poulain, D. (2008). Colonization of mice by candida albicans is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis*, 197(7):972–80.
- Jin, L., Yoshida, M., Nakamura, T., Ishikawa, H., Wakabayashi, G., Tanabe, M., Kawachi, S., Shinoda, M., Saikawa, Y., Wada, N., Kameyama, K., Kumai, K., Kubota, T., Sano, K., Nagao, K., Amagai, M., Kitagawa, Y., and Kitajima, M. (2008). Candida albicans infection delays duodenal ulcer healing in cysteamine-induced duodenal ulcers in rats. *Dig Dis Sci*, 53(11):2878–85.

- Joly, S., Ma, N., Sadler, J. J., Soll, D. R., Cassel, S. L., and Sutterwala, F. S. (2009). Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the nlrp3 inflammasome. *J Immunol*, 183(6):3578–81.
- Jones, H., Hargrove, L., Kennedy, L., Meng, F., Graf-Eaton, A., Owens, J., Alpini, G., Johnson, C., Bernuzzi, F., Demieville, J., DeMorrow, S., Invernizzi, P., and Francis, H. (2016). Inhibition of mast cell-secreted histamine decreases biliary proliferation and fibrosis in primary sclerosing cholangitis *mdr2*(-/-) mice. *Hepatology*, 64(4):1202–1216.
- Juillerat, P., Pittet, V., Bulliard, J. L., Guessous, I., Antonino, A. T., Mottet, C., Felley, C., Vader, J. P., and Michetti, P. (2008). Prevalence of inflammatory bowel disease in the canton of vaud (switzerland): A population-based cohort study. *J Crohns Colitis*, 2(2):131–41.
- Jung, W. H., Croll, D., Cho, J. H., Kim, Y. R., and Lee, Y. W. (2015). Analysis of the nasal vestibule mycobiome in patients with allergic rhinitis. *Mycoses*, 58(3):167–72.
- Jyonouchi, H., Geng, L., Cushing-Ruby, A., and Monteiro, I. M. (2010). Aberrant responses to tlr agonists in pediatric ibd patients; the possible association with increased production of th1/th17 cytokines in response to candida, a luminal antigen. *Pediatr Allergy Immunol*, 21(4 Pt 2):e747–55.
- Kabasawa, K., Itagaki, H., Ikeda, R., Shinoda, T., Kagaya, K., and Fukazawa, Y. (1991). Evaluation of a new method for identification of *Cryptococcus neoformans* which uses serologic tests aided by selected biological tests. *J Clin Microbiol*, 29(12):2873–6.
- Kaka, A. S. and Sarosi, G. A. (2017). Disseminated blastomycosis. *N Engl J Med*, 376(6):e9.
- Kali, A., Srirangaraj, S., and Charles, P. M. (2015). A cost-effective carbohydrate fermentation test for yeast using microtitre plate. *Indian J Med Microbiol*, 33(2):293–5.
- Kannan, P., Janaki, C., and Selvi, G. S. (2006). Prevalence of dermatophytes and other fungal agents isolated from clinical samples. *Indian J Med Microbiol*, 24(3):212–5.
- Kappelman, M. D., Rifas-Shiman, S. L., Porter, C. Q., Ollendorf, D. A., Sandler, R. S., Galanko, J. A., and Finkelstein, J. A. (2008). Direct health care costs of crohn’s disease and ulcerative colitis in us children and adults. *Gastroenterology*, 135(6):1907–13.
- Khot, P. D., Ko, D. L., and Fredricks, D. N. (2009). Sequencing and analysis of fungal rrna operons for development of broad-range fungal pcr assays. *Appl Environ Microbiol*, 75(6):1559–65.
- Kim, D. M., Lee, M. H., Suh, M. K., Ha, G. Y., Kim, H., and Choi, J. S. (2013). Onychomycosis caused by *Chaetomium globosum*. *Ann Dermatol*, 25(2):232–6.
- Kleessen, B., Kroesen, A. J., Buhr, H. J., and Blaut, M. (2009). Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 37(9):1034–1041.

- Koh, A. Y., Kohler, J. R., Coggs, K. T., Van Rooijen, N., and Pier, G. B. (2008). Mucosal damage and neutropenia are required for candida albicans dissemination. *PLoS Pathog*, 4(2):e35.
- Kuhbacher, T., Ott, S. J., Helwig, U., Mimura, T., Rizzello, F., Kleessen, B., Gionchetti, P., Blaut, M., Campieri, M., Folsch, U. R., Kamm, M. A., and Schreiber, S. (2006). Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (vsl#3) in pouchitis. *Gut*, 55(6):833–41.
- Kulaksiz, H., Rudolph, G., Kloeters-Plachky, P., Sauer, P., Geiss, H., and Stiehl, A. (2006). Biliary candida infections in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol*, 45(5):711–6.
- Lagace, J. and Cellier, E. (2012). A case report of a mixed chaetomium globosum/trichophyton mentagrophytes onychomycosis. *Med Mycol Case Rep*, 1(1):76–8.
- Lakatos, L., Kiss, L. S., David, G., Pandur, T., Erdelyi, Z., Mester, G., Balogh, M., Szpocs, I., Molnar, C., Komaromi, E., and Lakatos, P. L. (2011). Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in western hungary, 2002–2006. *Inflamm Bowel Dis*, 17(12):2558–65.
- Lapidus, A. (2006). Crohn’s disease in stockholm county during 1990–2001: an epidemiological update. *World J Gastroenterol*, 12(1):75–81.
- Lee, S. C., Corradi, N., Doan, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J., and Heitman, J. (2010). Evolution of the sex-related locus and genomic features shared in microsporidia and fungi. *PLoS One*, 5(5):e10539.
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G. D., Ruland, J., and Reis e Sousa, C. (2007). Syk- and card9-dependent coupling of innate immunity to the induction of t helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol*, 8(6):630–8.
- Lesage, S., Zouali, H., Cezard, J. P., Colombel, J. F., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Modigliani, R., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Merlin, F., Chamaillard, M., Jannot, A. S., Thomas, G., Hugot, J. P., Group, E.-I., Group, E., and Group, G. (2002). Card15/nod2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*, 70(4):845–57.
- Li, D., Xia, R., Zhang, Q., Bai, C., Li, Z., and Zhang, P. (2017). Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of china: an 8-year case-control study. *BMC Infect Dis*, 17(1):536.
- Li, Q., Wang, C., Tang, C., He, Q., Li, N., and Li, J. (2014a). Dysbiosis of gut fungal microbiota is associated with mucosal inflammation in crohn’s disease. *J Clin Gastroenterol*, 48(6):513–23.
- Li, Q., Wang, C., Tang, C., Li, N., and Li, J. (2012). Molecular-phylogenetic characterization of the microbiota in ulcerated and non-ulcerated regions in the patients with crohn’s disease. *PLoS One*, 7(4):e34939.

- Li, Y. C., Calvert, G., Hanrahan, C. J., Jones, K. B., and Randall, R. L. (2014b). Coccidiomycosis infection of the patella mimicking a neoplasm - two case reports. *BMC Med Imaging*, 14:8.
- Liguori, G., Lamas, B., Richard, M. L., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T. W., Di Simone, M. P., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., Campieri, M., and Sokol, H. (2016). Fungal dysbiosis in mucosa-associated microbiota of crohn's disease patients. *J Crohns Colitis*, 10(3):296–305.
- Lin, C. C., Wei, S. C., Lin, B. R., Tsai, W. S., Chen, J. S., Hsu, T. C., Lin, W. C., Huang, T. Y., Chao, T. H., Lin, H. H., Wong, J. M., and Lin, J. K. (2016). A retrospective analysis of 20-year data of the surgical management of ulcerative colitis patients in taiwan: a study of taiwan society of inflammatory bowel disease. *Intest Res*, 14(3):248–57.
- Lindberg, E., Jarnerot, G., and Huitfeldt, B. (1992). Smoking in crohn's disease: effect on localisation and clinical course. *Gut*, 33(6):779–82.
- Lindkvist, B., Benito de Valle, M., Gullberg, B., and Bjornsson, E. (2010). Incidence and prevalence of primary sclerosing cholangitis in a defined adult population in sweden. *Hepatology*, 52(2):571–7.
- Liu, J. Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S. C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J. C., Jostins, L., Shah, T., Abedian, S., Cheon, J. H., Cho, J., Dayani, N. E., Franke, L., Fuyuno, Y., Hart, A., Juyal, R. C., Juyal, G., Kim, W. H., Morris, A. P., Poustchi, H., Newman, W. G., Midha, V., Orchard, T. R., Vahedi, H., Sood, A., Sung, J. Y., Malekzadeh, R., Westra, H. J., Yamazaki, K., Yang, S. K., International Multiple Sclerosis Genetics, C., International, I. B. D. G. C., Barrett, J. C., Alizadeh, B. Z., Parkes, M., Bk, T., Daly, M. J., Kubo, M., Anderson, C. A., and Weersma, R. K. (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*, 47(9):979–986.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., and Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16s rrna. *Applied and environmental microbiology*, 63:4516–4522.
- Liu, X. P., Fan, S. R., Peng, Y. T., and Zhang, H. P. (2014). Species distribution and susceptibility of candida isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in southern china from 2003 to 2012. *J Mycol Med*, 24(2):106–11.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous c. albicans mutants are avirulent. *Cell*, 90(5):939–49.
- Loftus, E. V., J., Harewood, G. C., Loftus, C. G., Tremaine, W. J., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., Jewell, D. A., and Sandborn, W. J. (2005). Psc-ibd: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut*, 54(1):91–6.

- Lopez, L. F., Valencia, Y., Tobon, A. M., Velasquez, O., Santa, C. D., Caceres, D. H., Restrepo, A., and Cano, L. E. (2016). Childhood histoplasmosis in colombia: Clinical and laboratory observations of 45 patients. *Med Mycol*, 54(7):677–83.
- Lopez-Serrano, P., Perez-Calle, J. L., Carrera-Alonso, E., Perez-Fernandez, T., Rodriguez-Caravaca, G., Boixeda-de Miguel, D., and Fernandez-Rodriguez, C. M. (2009). Epidemiologic study on the current incidence of inflammatory bowel disease in madrid. *Rev Esp Enferm Dig*, 101(11):768–72.
- Luther, J., Dave, M., Higgins, P. D., and Kao, J. Y. (2010). Association between helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm Bowel Dis*, 16(6):1077–84.
- Ma, K. W., Chok, K. S., Chan, C. K., Dai, W. C., Sin, S. L., Lau, F. L., Chan, S. C., and Lo, C. M. (2017). Liver transplantation: a life-saving procedure following amatoxin mushroom poisoning. *Hong Kong Med J*, 23(1):93–6.
- Mahid, S. S., Minor, K. S., Stromberg, A. J., and Galandiuk, S. (2007). Active and passive smoking in childhood is related to the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 13(4):431–8.
- Mailer, R. K. W., Joly, A.-L., Liu, S., Elias, S., Tegner, J., and Andersson, J. (2015). Il-1 β promotes th17 differentiation by inducing alternative splicing of foxp3. *Scientific Reports*, 5:14674.
- Male, O. (1990). The significance of mycology in medicine. *Frontiers in Mycology. Wallingford: CAB International*, pages 131–156.
- Manser, C. N., Borovicka, J., Seibold, F., Vavricka, S. R., Lakatos, P. L., Fried, M., Rogler, G., and investigators of the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort, S. (2016). Risk factors for complications in patients with ulcerative colitis. *United European Gastroenterol J*, 4(2):281–7.
- Manter, D. K. and Vivanco, J. M. (2007). Use of the its1 primers, its1f and its4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qpcr and length heterogeneity analysis. *J Microbiol Methods*, 71(1):7–14.
- Mar, J. S., LaMere, B. J., Lin, D. L., Levan, S., Nazareth, M., Mahadevan, U., and Lynch, S. V. (2016). Disease severity and immune activity relate to distinct interkingdom gut microbiome states in ethnically distinct ulcerative colitis patients. *MBio*, 7(4).
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J. B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth,

- G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F., and Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057):376–80.
- Marinho, S. A., Teixeira, A. B., Santos, O. S., Cazanova, R. F., Ferreira, C. A., Cherubini, K., and de Oliveira, S. D. (2010). Identification of candida spp. by phenotypic tests and pcr. *Braz J Microbiol*, 41(2):286–94.
- Marr, K. A., Carter, R. A., Crippa, F., Wald, A., and Corey, L. (2002). Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 34(7):909–17.
- Masaki, K., Fukunaga, K., Matsusaka, M., Kabata, H., Tanosaki, T., Mochimaru, T., Kamatani, T., Ohtsuka, K., Baba, R., Ueda, S., Suzuki, Y., Sakamaki, F., Oyamada, Y., Inoue, T., Oguma, T., Sayama, K., Koh, H., Nakamura, M., Umeda, A., Kamei, K., Izuhara, K., Asano, K., and Betsuyaku, T. (2017). Characteristics of severe asthma with fungal sensitization. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 119(3):253–257.
- Maurya, V., Gugnani, H. C., Sarma, P. U., Madan, T., and Shah, A. (2005). Sensitization to aspergillus antigens and occurrence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma. *Chest*, 127(4):1252–9.
- McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18).
- McNeill, J. and Taxonomy, I. A. f. P. (2012). *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants (Melbourne Code): Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011*. Koeltz Scientific Books.
- Miranda, L. N., van der Heijden, I. M., Costa, S. F., Sousa, A. P., Sienra, R. A., Gobara, S., Santos, C. R., Lobo, R. D., Pessoa, V. P., J., and Levin, A. S. (2009). Candida colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect*, 72(1):9–16.
- Mittermaier, C., Dejaco, C., Waldhoer, T., Oefflerbauer-Ernst, A., Miehsler, W., Beier, M., Tilling, W., Gangl, A., and Moser, G. (2004). Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: A prospective 18-month follow-up study. *Psychosomatic Medicine*, 66(1):79–84.
- Mülhardt, C. (2013). *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. Springer Berlin Heidelberg.
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., and Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1):46–54 e42; quiz e30.

- Monard, C., Gantner, S., and Stenlid, J. (2013). Utilizing its1 and its2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol*, 84(1):165–75.
- Morris, A. J., Byrne, T. C., Madden, J. F., and Reller, L. B. (1996). Duration of incubation of fungal cultures. *J Clin Microbiol*, 34(6):1583–5.
- Motooka, D., Fujimoto, K., Tanaka, R., Yaguchi, T., Gotoh, K., Maeda, Y., Furuta, Y., Kurakawa, T., Goto, N., Yasunaga, T., Narazaki, M., Kumanogoh, A., Horii, T., Iida, T., Takeda, K., and Nakamura, S. (2017). Fungal its1 deep-sequencing strategies to reconstruct the composition of a 26-species community and evaluation of the gut mycobiota of healthy japanese individuals. *Front Microbiol*, 8:238.
- Mow, W. S., Vasilias, E. A., Lin, Y.-C., Fleshner, P. R., Papadakis, K. A., Taylor, K. D., Landers, C. J., Abreu-Martin, M. T., Rotter, J. I., Yang, H., and Targan, S. R. (2004). Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel crohn’s disease. *Gastroenterology*, 126(2):414–424.
- Muadcheingka, T. and Tantivitayakul, P. (2015). Distribution of candida albicans and non-albicans candida species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Arch Oral Biol*, 60(6):894–901.
- Muller, S., Styner, M., Seibold-Schmid, B., Flogerzi, B., Mahler, M., Konrad, A., and Seibold, F. (2005). Anti-saccharomyces cerevisiae antibody titers are stable over time in crohn’s patients and are not inducible in murine models of colitis. *World J Gastroenterol*, 11(44):6988–94.
- Musial, C. E., Cockerill, F. R., r., and Roberts, G. D. (1988). Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev*, 1(4):349–64.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rrna. *Applied and environmental microbiology*, 59:695–700.
- Nagano, Y., Elborn, J. S., Millar, B. C., Walker, J. M., Goldsmith, C. E., Rendall, J., and Moore, J. E. (2010). Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*, 48(1):166–76 e1.
- Naito, M. and Kurahara, Y. (2017). Coexistence of pulmonary aspergilloma and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Intern Med*, 56(15):2077–2078.
- Nakamura, T., Yoshida, M., Ishikawa, H., Kameyama, K., Wakabayashi, G., Otani, Y., Shimazu, M., Tanabe, M., Kawachi, S., Kumai, K., Kubota, T., Saikawa, Y., Sano, K., and Kitajima, M. (2007). Candida albicans aggravates duodenal ulcer perforation induced by administration of cysteamine in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 22(5):749–56.
- Naser, S. A., Sagrainsingh, S. R., Naser, A. S., and Thanigachalam, S. (2014). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis causes crohn’s disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol*, 20(23):7403–15.

- Nevoigt, E. (2008). Progress in metabolic engineering of *saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(3):379–412.
- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., and Larsson, K. H. (2008). Intraspecific its variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinform Online*, 4:193–201.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., and Kristiansson, E. (2009). The its region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol Lett*, 296(1):97–101.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K. H., and Koljalg, U. (2006). Taxonomic reliability of dna sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One*, 1:e59.
- Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M., Unterseher, M., Porter, T. M., Bengtsson-Palme, J., Walker, D. M., de Sousa, F., Gamper, H. A., Larsson, E., Larsson, K. H., Koljalg, U., Edgar, R. C., and Abarenkov, K. (2015). A comprehensive, automatically updated fungal its sequence dataset for reference-based chimera control in environmental sequencing efforts. *Microbes Environ*, 30(2):145–50.
- Nothlings, U. and Krawczak, M. (2012). [popgen. a population-based biobank with prospective follow-up of a control group]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 55(6-7):831–5.
- Nucci, M., Anaissie, E. J., Queiroz-Telles, F., Martins, C. A., Trabasso, P., Solza, C., Mangini, C., Simoes, B. P., Colombo, A. L., Vaz, J., Levy, C. E., Costa, S., Moreira, V. A., Oliveira, J. S., Paraguay, N., Duboc, G., Voltarelli, J. C., Maiolino, A., Pasquini, R., and Souza, C. A. (2003). Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and fusarium infection. *Cancer*, 98(2):315–9.
- Oguma, T., Taniguchi, M., Shimoda, T., Kamei, K., Matsuse, H., Hebisawa, A., Takayanagi, N., Konno, S., Fukunaga, K., Harada, K., Tanaka, J., Tomomatsu, K., and Asano, K. (2017). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in japan: A nationwide survey. *Allergol Int*.
- Olsson, R., Danielsson, A., Jarnerot, G., Lindstrom, E., Loof, L., Rolny, P., Ryden, B. O., Tysk, C., and Wallerstedt, S. (1991). Prevalence of primary sclerosing cholangitis in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 100(5 Pt 1):1319–23.
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., and Colpaert, J. V. (2014). Comparison and validation of some its primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS One*, 9(6):e97629.
- Orgiazzi, A., Lumini, E., Nilsson, R. H., Girlanda, M., Vizzini, A., Bonfante, P., and Bianciotto, V. (2012). Unravelling soil fungal communities from different mediterranean land-use backgrounds. *PLoS One*, 7(4):e34847.

- Osorio, F., LeibundGut-Landmann, S., Lochner, M., Lahl, K., Sparwasser, T., Eberl, G., and Reis e Sousa, C. (2008). Dc activated via dectin-1 convert treg into il-17 producers. *Eur J Immunol*, 38(12):3274–81.
- Ott, C., Obermeier, F., Thiel, S., Kemptner, D., Bauer, A., Scholmerich, J., Rogler, G., and Timmer, A. (2008a). The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of southern germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 20(9):917–23.
- Ott, S. J., Kuhbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A., Drews, O., Weichert, W., Timmis, K. N., and Schreiber, S. (2008b). Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol*, 43(7):831–41.
- Pakshir, K., Zomorodian, K., Zakaei, A., Motamedi, M., Rahimi Ghiasi, M., and Karamitalab, M. (2015). Molecular identification and in-vitro antifungal susceptibility testing of candida species isolated from patients with onychomycosis. *Curr Med Mycol*, 1(4):26–32.
- Partida-Martinez, L. P., Monajembashi, S., Greulich, K. O., and Hertweck, C. (2007). Endosymbiont-dependent host reproduction maintains bacterial-fungal mutualism. *Curr Biol*, 17(9):773–7.
- Pasqualotto, A. C., Zimmerman, R. A., Alves, S. H., Aquino, V. R., Branco, D., Wiltgen, D., do Amaral, A., Cechinel, R., Colares, S. M., da Rocha, I. G., Severo, L. C., and Sukiennik, T. C. (2008). Take control over your fluconazole prescriptions: the growing importance of candida glabrata as an agent of candidemia in brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29(9):898–9.
- Peeters, M., Joossens, S., Vermeire, S., Vlietinck, R., Bossuyt, X., and Rutgeerts, P. (2001). Diagnostic value of anti-saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 96(3):730–4.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., and Pavlovic, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ*, 77(9):754–66.
- Pereira, E., Santos, A., Reis, F., Tavares, R. M., Baptista, P., Lino-Neto, T., and Almeida-Aguiar, C. (2013). A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiol Res*, 168(1):1–5.
- Perkhofer, S., Lass-Florl, C., Hell, M., Russ, G., Krause, R., Honigl, M., Geltner, C., Auberger, J., Gastl, G., Mitterbauer, M., Willinger, B., Knobl, P., Resch, G., Waldner, R., Makrai, A., Hartmann, G., Girschikofsky, M., and Greil, R. (2010). The nationwide austrian aspergillus registry: a prospective data collection on epidemiology, therapy and outcome of invasive mould infections in immunocompromised and/or immunosuppressed patients. *Int J Antimicrob Agents*, 36(6):531–6.
- Perlroth, J., Choi, B., and Spellberg, B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*, 45(4):321–46.

- Pfaller, M. A., Andes, D. R., Diekema, D. J., Horn, D. L., Reboli, A. C., Rotstein, C., Franks, B., and Azie, N. E. (2014). Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of candida in 2,496 patients: data from the prospective antifungal therapy (path) registry 2004-2008. *PLoS One*, 9(7):e101510.
- Phair, J., Munoz, A., Detels, R., Kaslow, R., Rinaldo, C., and Saah, A. (1990). The risk of pneumocystis carinii pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. multicenter aids cohort study group. *N Engl J Med*, 322(3):161–5.
- Porter, T. M. and Golding, G. B. (2011). Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (its) metagenomic amplicons? *New Phytol*, 192(3):775–82.
- Qi, L. N., Bai, T., Chen, Z. S., Wu, F. X., Chen, Y. Y., De Xiang, B., Peng, T., Han, Z. G., and Li, L. Q. (2015). The p53 mutation spectrum in hepatocellular carcinoma from guangxi, china : role of chronic hepatitis b virus infection and aflatoxin b1 exposure. *Liver Int*, 35(3):999–1009.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J. M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Meta, H. I. T. C., Bork, P., Ehrlich, S. D., and Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285):59–65.
- Quinton, J. F., Sendid, B., Reumaux, D., Duthilleul, P., Cortot, A., Grandbastien, B., Charrier, G., Targan, S. R., Colombel, J. F., and Poulain, D. (1998). Anti-saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut*, 42(6):788–91.
- Rankin, G. B., Watts, H. D., Melnyk, C. S., and Kelley, M. L., J. (1979). National cooperative crohn’s disease study: extraintestinal manifestations and perianal complications. *Gastroenterology*, 77(4 Pt 2):914–20.
- Rasmussen, H. H., Fallingborg, J. F., Mortensen, P. B., Vyberg, M., Tage-Jensen, U., and Rasmussen, S. N. (1997). Hepatobiliary dysfunction and primary sclerosing cholangitis in patients with crohn’s disease. *Scand J Gastroenterol*, 32(6):604–10.
- Reuter, J. A., Spacek, D. V., and Snyder, M. P. (2015). High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell*, 58(4):586–97.
- Rieder, F., Lopez, R., Franke, A., Wolf, A., Schleder, S., Dirmeier, A., Schirbel, A., Rosenstiel, P., Dotan, N., Schreiber, S., Rogler, G., and Klebl, F. (2011). Characterization of changes in serum anti-glycan antibodies in crohn’s disease—a longitudinal analysis. *PLoS One*, 6(5):e18172.
- Rieth, H. (1967). D-h-s-diagnostik. *Fortschr Med*, 85:594–595.

- Rivas, M. A., Beaudoin, M., Gardet, A., Stevens, C., Sharma, Y., Zhang, C. K., Boucher, G., Ripke, S., Ellinghaus, D., Burt, N., Fennell, T., Kirby, A., Latiano, A., Goyette, P., Green, T., Halfvarson, J., Haritunians, T., Korn, J. M., Kuruvilla, F., Lagace, C., Neale, B., Lo, K. S., Schumm, P., Torkvist, L., National Institute of, D., Digestive Kidney Diseases Inflammatory Bowel Disease Genetics, C., United Kingdom Inflammatory Bowel Disease Genetics, C., International Inflammatory Bowel Disease Genetics, C., Dubinsky, M. C., Brant, S. R., Silverberg, M. S., Duerr, R. H., Altshuler, D., Gabriel, S., Lettre, G., Franke, A., D'Amato, M., McGovern, D. P., Cho, J. H., Rioux, J. D., Xavier, R. J., and Daly, M. J. (2011). Deep resequencing of gwas loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*, 43(11):1066–73.
- Rodrigo, L., Riestra, S., Nino, P., Cadahia, V., Tojo, R., Fuentes, D., Moreno, M., Gonzalez Balina, E., and Fernandez, E. (2004). A population-based study on the incidence of inflammatory bowel disease in oviedo (northern spain). *Rev Esp Enferm Dig*, 96(5):296–305.
- Rogers, N. C., Slack, E. C., Edwards, A. D., Nolte, M. A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D. L., Gordon, S., Tybulewicz, V. L., Brown, G. D., and Reis e Sousa, C. (2005). Syk-dependent cytokine induction by dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for c type lectins. *Immunity*, 22(4):507–17.
- Romberg-Camps, M. J., Hesselink-van de Kruijs, M. A., Schouten, L. J., Dagnelie, P. C., Limonard, C. B., Kester, A. D., Bos, L. P., Goedhard, J., Hameeteman, W. H., Wolters, F. L., Russel, M. G., and Stockbrugger, R. W. (2009). Inflammatory bowel disease in south limburg (the netherlands) 1991-2002: Incidence, diagnostic delay, and seasonal variations in onset of symptoms. *J Crohns Colitis*, 3(2):115–24.
- Ronnblom, A., Samuelsson, S. M., and Ekblom, A. (2010). Ulcerative colitis in the county of uppsala 1945-2007: incidence and clinical characteristics. *J Crohns Colitis*, 4(5):532–6.
- Samayoa, B., Roy, M., Cleveland, A. A., Medina, N., Lau-Bonilla, D., Scheel, C. M., Gomez, B. L., Chiller, T., and Arathoon, E. (2017). High mortality and coinfection in a prospective cohort of human immunodeficiency virus/acquired immune deficiency syndrome patients with histoplasmosis in guatemala. *Am J Trop Med Hyg*, 97(1):42–48.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–7.
- Schaffer, T., Muller, S., Flogerzi, B., Seibold-Schmid, B., Schoepfer, A. M., and Seibold, F. (2007). Anti-saccharomyces cerevisiae mannan antibodies (asca) of crohn's patients crossreact with mannan from other yeast strains, and murine asca igm can be experimentally induced with candida albicans. *Inflamm Bowel Dis*, 13(11):1339–46.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding, C., and Fungal Barcoding Consortium Author, L. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (its) region as a universal dna barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(16):6241–6.

- Schubert, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., Starink, M., Hill, C. F., Zalar, P., de Hoog, G. S., and Crous, P. W. (2007). Biodiversity in the cladosporium herbarum complex (davidiellaceae, capnoidiales), with standardisation of methods for cladosporium taxonomy and diagnostics. *Stud Mycol*, 58:105–56.
- Scognamiglio, T., Zinchuk, R., Gumpeni, P., and Larone, D. H. (2010). Comparison of inhibitory mold agar to sabouraud dextrose agar as a primary medium for isolation of fungi. *J Clin Microbiol*, 48(5):1924–5.
- Seeliger, H. P. (1956). Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *J Bacteriol*, 72(2):127–31.
- Selander, C., Engblom, C., Nilsson, G., Scheynius, A., and Andersson, C. L. (2009). Tlr2/myd88-dependent and -independent activation of mast cell ige responses by the skin commensal yeast malassezia sympodialis. *J Immunol*, 182(7):4208–16.
- Sendid, B., Dotan, N., Nseir, S., Savaux, C., Vandewalle, P., Standaert, A., Zerimech, F., Guery, B. P., Dukler, A., Colombel, J. F., and Poulain, D. (2008). Antibodies against glucan, chitin, and saccharomyces cerevisiae mannan as new biomarkers of candida albicans infection that complement tests based on c. albicans mannan. *Clin Vaccine Immunol*, 15(12):1868–77.
- Sendid, B., Quinton, J. F., Charrier, G., Goulet, O., Cortot, A., Grandbastien, B., Poulain, D., and Colombel, J. F. (1998). Anti-saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in familial crohn’s disease. *Am J Gastroenterol*, 93(8):1306–10.
- Seow, C. H., Stempak, J. M., Xu, W., Lan, H., Griffiths, A. M., Greenberg, G. R., Steinhart, A. H., Dotan, N., and Silverberg, M. S. (2009). Novel anti-glycan antibodies related to inflammatory bowel disease diagnosis and phenotype. *Am J Gastroenterol*, 104(6):1426–34.
- Shendure, J., Porreca, G. J., Reppas, N. B., Lin, X., McCutcheon, J. P., Rosenbaum, A. M., Wang, M. D., Zhang, K., Mitra, R. D., and Church, G. M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*, 309(5741):1728–32.
- Sheppard, D. C., Locas, M. C., Restieri, C., and Laverdiere, M. (2008). Utility of the germ tube test for direct identification of candida albicans from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*, 46(10):3508–9.
- Shimomura, I., Takase, Y., Matsumoto, S., Kuyama, J., Nakajima, T., Maeda, H., Sugase, T., Hata, A., Hanada, M., and Okuno, M. (1996). Primary sclerosing cholangitis associated with increased peripheral eosinophils and serum ige. *J Gastroenterol*, 31(5):737–41.
- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., and van Blankenstein, M. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across europe: is there a difference between north and south? results of the european collaborative study on inflammatory bowel disease (ec-ibd). *Gut*, 39(5):690–7.

- Simon, G. L. and Gorbach, S. L. (1984). Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*, 86(1):174–93.
- Sincic, B. M., Vucelic, B., Persic, M., Brncic, N., Erzen, D. J., Radakovic, B., Micovic, V., and Stimac, D. (2006). Incidence of inflammatory bowel disease in primorsko-goranska county, croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. *Scand J Gastroenterol*, 41(4):437–44.
- Sivignon, A., de Vallee, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignede, G., Vandekerckove, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* cncm i-3856 prevents colitis induced by aiec bacteria in the transgenic mouse model mimicking crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21(2):276–86.
- Slavin, M., van Hal, S., Sorrell, T. C., Lee, A., Marriott, D. J., Daveson, K., Kennedy, K., Hajkiewicz, K., Halliday, C., Athan, E., Bak, N., Cheong, E., Heath, C. H., Orla Morrissey, C., Kidd, S., Beresford, R., Blyth, C., Korman, T. M., Owen Robinson, J., Meyer, W., Chen, S. C., Australia, and New Zealand Mycoses Interest, G. (2015). Invasive infections due to filamentous fungi other than aspergillus: epidemiology and determinants of mortality. *Clin Microbiol Infect*, 21(5):490 e1–10.
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H. P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Langella, P., Skurnik, D., Richard, M. L., and Beaugerie, L. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in ibd. *Gut*, 66(6):1039–1048.
- Song, Y. B., Suh, M. K., Ha, G. Y., and Kim, H. (2015). Antifungal susceptibility testing with etest for candida species isolated from patients with oral candidiasis. *Ann Dermatol*, 27(6):715–20.
- Soyucen, E., Gulcan, A., Aktuglu-Zeybek, A. C., Onal, H., Kiykim, E., and Aydin, A. (2014). Differences in the gut microbiota of healthy children and those with type 1 diabetes. *Pediatr Int*, 56(3):336–43.
- Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Vandewalle, P., Mille, C., Seddik, M., Sendid, B., Mallet, J. M., Colombel, J. F., and Poulain, D. (2006). *Candida albicans* is an immunogen for anti-*saccharomyces cerevisiae* antibody markers of crohn’s disease. *Gastroenterology*, 130(6):1764–75.
- Standaert-Vitse, A., Sendid, B., Joossens, M., Francois, N., Vandewalle-El Khoury, P., Branche, J., Van Kruiningen, H., Jouault, T., Rutgeerts, P., Gower-Rousseau, C., Libersa, C., Neut, C., Broly, F., Chamaillard, M., Vermeire, S., Poulain, D., and Colombel, J. F. (2009). *Candida albicans* colonization and asca in familial crohn’s disease. *Am J Gastroenterol*, 104(7):1745–53.
- Stange, E. F., Travis, S. P., Vermeire, S., Reinisch, W., Geboes, K., Barakauskiene, A., Feakins, R., Flejou, J. F., Herfarth, H., Hommes, D. W., Kupcinskas, L., Lakatos, P. L., Mantzaris, G. J., Schreiber, S., Villanacci, V., Warren, B. F., European, C., and Colitis, O. (2008). European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*, 2(1):1–23.

- Steadham, J. E., Geis, P. A., and Simmank, J. L. (1986). Use of carbohydrate and nitrate assimilations in the identification of dematiaceous fungi. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 5(1):71–5.
- Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A. G., Zheng, M., Brown, G. D., Gordon, S., Shellito, J. E., and Kolls, J. K. (2003). Alveolar macrophage-mediated killing of pneumocystis carinii f. sp. muris involves molecular recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med*, 198(11):1677–88.
- Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G., Kaufmann, S., and Schulz, T. (2012). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Suhr, M. J. and Hallen-Adams, H. E. (2015). The human gut mycobiome: pitfalls and potentials—a mycologist’s perspective. *Mycologia*, 107(6):1057–73.
- Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F., Thompson, R. A., and Weinstock, J. V. (2005). Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 128(4):825–832.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., and Lochs, H. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122(1):44–54.
- Takahashi-Nakaguchi, A., Muraosa, Y., Hagiwara, D., Sakai, K., Toyotome, T., Watanabe, A., Kawamoto, S., Kamei, K., Gono, T., and Takahashi, H. (2015). Genome sequence comparison of aspergillus fumigatus strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*, 53(4):353–60.
- Takeuchi (2006). Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. In *CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, volume 4, pages 196–202. Elsevier BV.
- Tanaka, A., Fujiwara, A., Uchida, Y., Yamaguchi, M., Ohta, S., Homma, T., Watanabe, Y., Yamamoto, M., Suzuki, S., Yokoe, T., and Sagara, H. (2016). Evaluation of the association between sensitization to common inhalant fungi and poor asthma control. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 117(2):163–168 e1.
- Targan, S. R., Feagan, B., Vermeire, S., Panaccione, R., Melmed, G. Y., Landers, C., Li, D., Russell, C., Newmark, R., Zhang, N., Chon, Y., Hsu, Y. H., Lin, S. L., and Klekotka, P. (2016). A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study of brodalumab in patients with moderate-to-severe crohn’s disease. *Am J Gastroenterol*, 111(11):1599–1607.
- Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., and Wong, S. Y. C. (2002). The -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *The Journal of Immunology*, 169(7):3876–3882.

- Tedersoo, L., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., Bahram, M., Bechem, E., Chuyong, G., and Koljalg, U. (2010). 454 pyrosequencing and sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytol*, 188(1):291–301.
- Teml, A., Kratzer, V., Schneider, B., Lochs, H., Norman, G. L., Gangl, A., Vogelsang, H., and Reinisch, W. (2003). Anti-saccharomyces cerevisiae antibodies: a stable marker for crohn’s disease during steroid and 5-aminosalicylic acid treatment. *Am J Gastroenterol*, 98(10):2226–31.
- Terg, R., Sambuelli, A., Coronel, E., Mazzuco, J., Cartier, M., Negreira, S., Munoz, A., Gil, A., Miguez, C., Huernos, S., Romero, G., Goncalvez, S., Levi, D., and Abecasis, R. (2008). Prevalence of primary sclerosing cholangitis in patients with ulcerative colitis and the risk of developing malignancies. a large prospective study. *Acta Gastroenterol Latinoam*, 38(1):26–33.
- Timmer, A., Sutherland, L. R., and Martin, F. (1998). Oral contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in crohn’s disease. the canadian mesalamine for remission of crohn’s disease study group. *Gastroenterology*, 114(6):1143–50.
- Tomoda, T., Nakano, Y., and Kageyama, T. (1988). Intestinal candida overgrowth and candida infection in patients with leukemia: Effect of bifidobacterium administration. *Bifidobacteria and Microflora*, 7(2):71–74.
- Torres-Rodriguez, J. M., Pulido-Marrero, Z., and Vera-Garcia, Y. (2012). Respiratory allergy to fungi in barcelona, spain: clinical aspects, diagnosis and specific treatment in a general allergy unit. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 40(5):295–300.
- Underhill, D. M., Rossnagle, E., Lowell, C. A., and Simmons, R. M. (2005). Dectin-1 activates syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood*, 106(7):2543–50.
- Ungpakorn, R., Ayutyanont, T., Reangchainam, S., and Supanya, S. (2004). Treatment of microsporum spp. tinea capitis with pulsed oral terbinafine. *Clin Exp Dermatol*, 29(3):300–3.
- Valdivia, L., Nix, D., Wright, M., Lindberg, E., Fagan, T., Lieberman, D., Stoffer, T., Ampel, N. M., and Galgiani, J. N. (2006). Coccidioidomycosis as a common cause of community-acquired pneumonia. *Emerg Infect Dis*, 12(6):958–62.
- Valinsky, L., Della Vedova, G., Jiang, T., and Borneman, J. (2002). Oligonucleotide fingerprinting of rrna genes for analysis of fungal community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12):5999–6004.
- van der Velden, W. J., Netea, M. G., de Haan, A. F., Huls, G. A., Donnelly, J. P., and Blijlevens, N. M. (2013). Role of the mycobiome in human acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 19(2):329–32.

- Vasiliauskas, E. A., Kam, L. Y., Karp, L. C., Gaiennie, J., Yang, H., and Targan, S. R. (2000). Marker antibody expression stratifies crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut*, 47(4):487–96.
- Vendramin, A. and Brvar, M. (2014). Amanita muscaria and amanita pantherina poisoning: two syndromes. *Toxicon*, 90:269–72.
- Vermeire, S., Peeters, M., Vlietinck, R., Joossens, S., Den Hond, E., Bulteel, V., Bossuyt, X., Geypens, B., and Rutgeerts, P. (2001). Anti-saccharomyces cerevisiae antibodies (asca), phenotypes of ibd, and intestinal permeability: a study in ibd families. *Inflamm Bowel Dis*, 7(1):8–15.
- Vilgalys, D. and Gonzalez, D. (1990). Organization of ribosomal dna in the basidiomycete thanatephorus praticola. *Curr Genet*, 18(3):277–80.
- Villani, A. C., Lemire, M., Fortin, G., Louis, E., Silverberg, M. S., Collette, C., Baba, N., Libioulle, C., Belaiche, J., Bitton, A., Gaudet, D., Cohen, A., Langelier, D., Fortin, P. R., Wither, J. E., Sarfati, M., Rutgeerts, P., Rioux, J. D., Vermeire, S., Hudson, T. J., and Franchimont, D. (2009). Common variants in the nlrp3 region contribute to crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*, 41(1):71–6.
- Vind, I., Riis, L., Jess, T., Knudsen, E., Pedersen, N., Elkjaer, M., Bak Andersen, I., Wewer, V., Norregaard, P., Moesgaard, F., Bendtsen, F., Munkholm, P., and group, D. s. (2006). Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in copenhagen city and county, 2003-2005: a population-based study from the danish crohn colitis database. *Am J Gastroenterol*, 101(6):1274–82.
- Walker, J. R., Ediger, J. P., Graff, L. A., Greenfeld, J. M., Clara, I., Lix, L., Rawsthorne, P., Miller, N., Rogala, L., McPhail, C. M., and Bernstein, C. N. (2008). The manitoba ibd cohort study: a population-based study of the prevalence of lifetime and 12-month anxiety and mood disorders. *Am J Gastroenterol*, 103(8):1989–97.
- Walker, L. J., Aldhous, M. C., Drummond, H. E., Smith, B. R. K., Nimmo, E. R., Arnott, I. D. R., and Satsangi, J. (2004). Anti-saccharomyces cerevisiae antibodies (asca) in crohn's disease are associated with disease severity but not nod2/card15 mutations. *Clinical and Experimental Immunology*, 135(3):490–496.
- Wang, H., Liu, Y., Chen, S. C., Long, Y., Kong, F., and Xu, Y. C. (2016). Chaetomium atrobrunneum and aspergillus fumigatus in multiple tracheal aspirates: Copathogens or symbiosis. *J Microbiol Immunol Infect*, 49(2):281–5.
- Whittaker, R. H. (1969). New concepts of kingdoms or organisms. evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, 163(3863):150–60.

- Wu, X. W., Ji, H. Z., Yang, M. F., Wu, L., and Wang, F. Y. (2015). *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease in asians: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*, 21(15):4750–6.
- Wyatt, J., Vogelsang, H., Hubl, W., Waldhoer, T., and Lochs, H. (1993). Intestinal permeability and the prediction of relapse in crohn’s disease. *Lancet*, 341(8858):1437–9.
- Yin, B., Xiao, Y., Ran, Y., Kang, D., Dai, Y., and Lama, J. (2013). *Microsporium canis* infection in three familial cases with tinea capitis and tinea corporis. *Mycopathologia*, 176(3-4):259–65.
- Yuen, T. K., Hyde, K. D., and Hodgkiss, I. J. (1999). Interspecific interactions among tropical and subtropical freshwater fungi. *Microbial Ecology*, 37(4):257–262.
- Zhang, J. Y., Liu, J. H., Liu, F. D., Xia, Y. H., Wang, J., Liu, X., Zhang, Z. Q., Zhu, N., Yan, Y., Ying, Y., and Huang, X. T. (2014). Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. *Mycoses*, 57(10):584–91.
- Zhang, X., Yang, M., Hu, J., Zhao, H., and Li, L. (2017). Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis in patients with liver failure: Clinical presentation, risk factors, and outcomes. *J Int Med Res*, page 300060517729907.
- Zhernakova, A., Festen, E. M., Franke, L., Trynka, G., van Diemen, C. C., Monsuur, A. J., Bevoa, M., Nijmeijer, R. M., van ’t Slot, R., Heijmans, R., Boezen, H. M., van Heel, D. A., van Bodegraven, A. A., Stokkers, P. C., Wijmenga, C., Crusius, J. B., and Weersma, R. K. (2008). Genetic analysis of innate immunity in crohn’s disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring card9 and il18rap. *Am J Hum Genet*, 82(5):1202–10.
- Zwolinska-Wcislo, M., Brzozowski, T., Budak, A., Kwiecien, S., Sliwowski, Z., Drozdowicz, D., Trojanowska, D., Rudnicka-Sosin, L., Mach, T., Konturek, S. J., and Pawlik, W. W. (2009). Effect of candida colonization on human ulcerative colitis and the healing of inflammatory changes of the colon in the experimental model of colitis ulcerosa. *J Physiol Pharmacol*, 60(1):107–18.
- Zwolinska-Wcislo, M., Budak, A., Bogdal, J., Trojanowska, D., and Stachura, J. (2001). Effect of fungal colonization of gastric mucosa on the course of gastric ulcers healing. *Med Sci Monit*, 7(2):266–75.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Andre Franke für die Überlassung des Promotionsthemas und hierdurch die Möglichkeit, wissenschaftliches Arbeiten und Denken zu erlernen. Auch bei Dr. rer. nat. Corinna Bang möchte ich mich ganz besonders für die wertvolle Unterstützung sowie freundliche und konstruktive Kritik während der Erarbeitung meiner Dissertation bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Malte Rühlemann für seine große Unterstützung zum Fortschritt meiner Arbeit. Herzlich möchte ich auch Ilona Urbach, dem restlichen Labor-team und allen anderen, die direkt und indirekt zu dieser Arbeit beigetragen haben, für all ihre Hilfe danken. Diese Arbeit wäre mir ohne die finanzielle Unterstützung der deutschen Forschungsgesellschaft über das Graduiertenkolleg „Gene, Umwelt und Entzündung“ nicht möglich gewesen. Auch hierfür möchte ich meinen Dank aussprechen.

Darüber hinaus möchte ich meinen besonderen Dank meinem Ehemann Arsenij Solovjev für seine unendliche Unterstützung sowie Dr. rer. nat. Anke Drescher für ihren Einsatz in einer entscheidenden Phase aussprechen. Und – natürlich - meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern, die mich mein komplettes Studium über begleitet und unterstützt haben.